

Aus: Medizinische Klinik der Freien Universität Berlin im Klinikum Steglitz
Direktor: Professor Dr. R. Schröder

EINFLUSS VON NATRIUM-IONEN AUF DIE KINETIK DER REAKTION ZWISCHEN RENIN UND RENIN-SUBSTRAT

Inaugural-Dissertation
zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Peter Weber

Berlin

1973
—

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543104_0003

Aus: Medizinische Klinik der Freien Universität Berlin im Klinikum Steglitz

Direktor: Professor Dr. R. Schröder

EINFLUSS VON NATRIUM-IONEN AUF DIE KINETIK DER REAKTION ZWISCHEN RENIN UND RENIN-SUBSTRAT

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Peter Weber

Berlin

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Oelkers

Korreferent: Prof. Dr. Michael Wiederholt

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin



Promoviert am: 18. 6. 1973

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>I. EINLEITUNG</u>	5
1. Renin	5
2. Bildungsort von Renin	6
3. Mechanismen der Reninsekretion	8
4. Direkter Einfluß der Natrium-Ionenkonzentration auf die Renin-Substrat-Reaktion	11
<u>II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	12
A) Begründung der Untersuchungen; Versuchsplan	12
B) Vorversuche	13
C) Methodik der Hauptversuche	14
1. Messung von Angiotensin an der Ratte	14
2. Präparation von Renin und Substrat	16
a) menschliches Renin	16
b) Rindersubstrat und Konzentrierung	17
c) Hammelsubstrat und Konzentrierung	18
3. Charakterisierung der Präparate	19
a) Bestimmung des Substratgehaltes	19
b) Bestimmung der Angiotensinaseaktivität von Renin- und Substrat-Präparaten	20
c) Bestimmung der Reninaktivität in den Substrat-Präparaten	20
d) Zusammenfassende Charakterisierung der für die Hauptversuche verwendeten Substrat- und Renin-Präparate	21
4. Methodik der Versuche zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit mit verschiedenen Ionen	21
a) Rindersubstrat	21
b) Hammelsubstrat	22

	Seite
5. Methodik der Versuche zur Bestimmung der Michaelis- konstanten	22
a) Rindersubstrat	22
b) Hammelsubstrat	23
c) Rindersubstrat nach Boucher	24
d) Hammelsubstrat nach Boucher	24
<u>III. ERGEBNISSE</u>	26
1. Einfluß von Natriumsalzen auf die Renin-Substrat-Reaktion	26
a) Rindersubstrat	26
b) Hammelsubstrat	31
2. Bestimmung der Michaeliskonstanten bei verschiedenen Elektrolytkonzentrationen für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und	
a) Rindersubstrat	36
b) Hammelsubstrat	40
c) Rindersubstrat nach Boucher	44
d) Hammelsubstrat nach Boucher	46
<u>IV. DISKUSSION</u>	49
<u>V. ZUSAMMENFASSUNG</u>	60
<u>VI. TABELLEN</u>	63
<u>VII. LITERATURVERZEICHNIS</u>	83

I. EINLEITUNG

1. Renin

Im Jahre 1898 entdeckten Tigerstedt und Bergman (53) in Kaninchen-Nieren-Extrakten eine blutdrucksteigernde Substanz, die sie Renin nannten. Renin ist eine Protease.

Bei Einwirkung auf ein Protein-Substrat (Angiotensinogen), welches in der Leber synthetisiert wird (31,37) und der α_2 -Globulinfraction des Plasmas angehört (39), setzt Renin ein Polypeptid (Angiotensin I) frei.

Früher nannten Page und Helmer (27) dieses Reaktionsprodukt Angiotonin, Braun-Menendez (2) das gleiche Produkt Hypertensin. Beide Arbeitsgruppen einigten sich 1958 auf den Namen Angiotensin (3).

Renin greift, wie schon angedeutet, in spezifischer Weise eine Leucyl-Leucin-Bindung des Angiotensinogens in Stellung 10 und 11 an und setzt so das Decapeptid Angiotensin I frei.

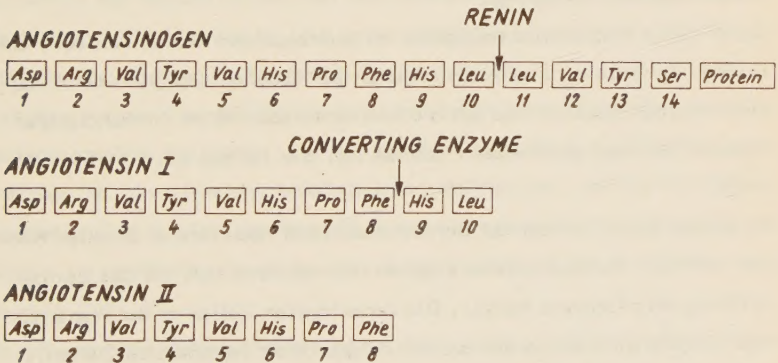


Abb. 1: Freisetzung von Angiotensin I aus Angiotensinogen durch Renin. Bildung von Angiotensin II durch das "Coverting enzyme".

Mit Hilfe des "Converting enzyme" wird das Angiotensin I durch Abspaltung eines Dipeptides (His-Leu) in das vasopressorisch wirksame Octapeptid Angiotensin II überführt. (44) (siehe Abb. 1)

Inzwischen ist Renin in den Nieren aller untersuchten Säugetiere (z.B. Ratte, Maus, Schwein, Rind, Pferd, Affe, Mensch) und auch bei anderen Vertebraten nachgewiesen worden. (23)

2. Bildungsort von Renin

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere wird als Nephron bezeichnet. Ein Nephron setzt sich aus Glomerulum, proximalem Konvolut, Henlescher Schleife, distalem Konvolut und einem Teil des Sammelrohres zusammen.

Durch die glomerulären Kapillaren wird vom Blutplasma eine dem Plasma isotone Flüssigkeit, der sog. Primärharn, abgepreßt und im proximalen Tubulus durch konstante isotone Rückresorption auf 20 % seines ursprünglichen Volumens eingeengt.

Durch aktive Natriumrückresorption im aufsteigenden dicken Teil der Henleschen Schleife wird der Natriumgehalt der Tubulusflüssigkeit beim weiteren Verlauf reduziert, so daß die Natriumkonzentration im frühdistalen Tubulus niedriger als die des Plasmas ist. Sie beträgt ca. 20 - 50 meq/l (52).

An dieser Stelle, an der der Schleifenschenkel noch einmal direkten Kontakt mit dem Gefäßpol seines eigenen Glomerulums hat, ist das Epithel auffällig dick (macula densa). Die benachbarten Zellen in der Wand des vas afferens sind sehr plasmareich und granuliert (epitheloide Zellen).

Dieser Bezirk mit seinen strukturellen Bestandteilen wird als juxtaglomerulärer Apparat bezeichnet. (siehe Abb. 2)

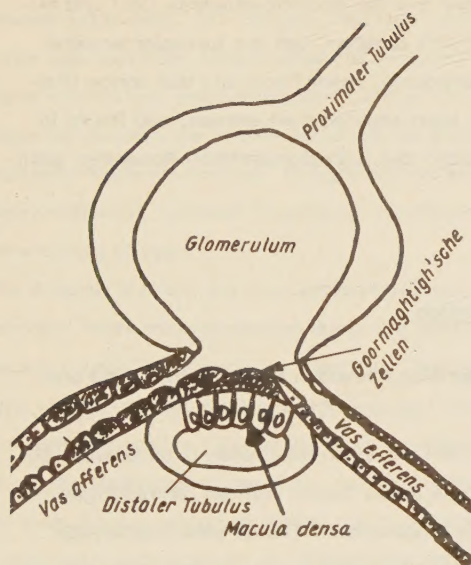


Abb. 2:

Schematische Darstellung des juxtaglomerulären Apparates (Die Schraffierung in den Zellen des vas afferens stellt die reninhaltige Granula dar.)

Zwischen der Macula densa, den vasa afferentia und efferentia liegen die Goormaghtigh'schen Zellen, die unter bestimmten Bedingungen die Funktion der epitheloiden Zellen annehmen können (30).

Untersuchungen über den Reningehalt der verschiedenen Schichten der Niere ergaben, daß in den Zonen, die frei von Glomerula sind, kein Renin nachweisbar ist. Verschiedene Arbeitsgruppen stellten fest, daß die Reninkonzentration und die Zahl der Granula in den juxtaglomerulären (epitheloiden) Zellen im marknahen Rindenbereich deutlich niedriger als im äußeren Cortex sind (6,7,17,18).

Durch spezielle Färbemethoden lassen sich in den juxtaglomerulären Zellen Granula darstellen. Je höher die Anzahl der Granula ist, desto mehr Renin ist aus der Niere extrahierbar (54).

Die vorher beschriebenen epitheloiden Zellen können unter verschiedenen Bedingungen die Anzahl und Größe ihrer Granula verändern. Robertson und Szalay, denen es gelungen ist, Nierengewebe, das reich an Granula war, in

vitro zu züchten, konnten zeigen, daß diese Zellen in vitro Renin bilden konnten. (43,50). Untersuchungen mit der Antikörpertchnik (26) und Mikrodissektionsversuche (6,7,16,21) ergaben, daß die juxtaglomerulären Apparate, besonders die vasa afferentia, mehr Renin als das übrige Nierenparenchym enthalten. Somit kann angenommen werden, daß Renin in den Granula der epitheloiden Zellen des juxtaglomerulären Apparates gebildet und gespeichert wird.

3. Mechanismen der Reninsekretion

Die zur Abgabe von Renin an das Blut führenden Mechanismen sind erst teilweise bekannt.

Goormaghtigh (19) hat bereits 1944 auf einen möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen den macula densa Zellen und den reninhaltigen Epitheloidzellen im vas afferens hingewiesen. Tobian entwickelte eine Theorie, nach der Dehnungs- oder Volumenrezeptoren in den vasa afferentia vorhanden sind, welche die Reninabgabe aus den juxtaglomerulären Zellen beeinflussen. Eine Verminderung des Perfusionsdruckes im vas afferens durch Konstriktion einer Nierenarterie bewirkt danach eine vermehrte Reninsekretion (47,55). Durch Diuretika und osmotische Diurese gelingt es jedoch, die vermehrte Reninsekretion aufzuheben, ohne daß sich der Perfusionsdruck normalisiert (56).

Andere Arbeitsgruppen (9,56) fanden eine negative Korrelation zwischen Reninaktivität im Nierenvenenblut und der Natriumausscheidung pro Zeiteinheit im Urin. Diese Befunde wurden von Vander (57) folgendermaßen erklärt: Die Natriumkonzentration im Bereich der Macula densa ist normalerweise gegenüber dem Plasma stark hypoton. Die Macula densa des frühdistalen Tubulus ist entweder empfindlich für die dort herrschende Natriumkonzentration oder für das totale "Natrium-Load" im frühdistalen Tubulus, registriert diese Information und vermittelt sie an die juxtaglomerulären Zellen des gleichen Nephrons, die dann mehr oder weniger Renin in

in das Blut im *vas afferens* abgeben. In Mikropunktionsversuchen konnten Thureau und Mitarb. (51) zeigen, daß nach retrograder Injektion von isotonischer oder zweifach isotonischer NaCl-Lösung in den distalen Tubulus der Ratte ein Kollaps des proximalen Tubulus eintritt. Der Kollaps ist nach Ansicht der Autoren durch eine Abnahme der glomerulären Filtration des betroffenen Nephrons bedingt. Die gleiche Wirkung hatten die Injektionen von Natriumbromid, während Injektionen von Cholinchlorid oder Mannitlösung ohne Erfolg blieben.

Die Autoren stellten die Arbeitshypothese auf, daß nach Perception einer erhöhten Natriumkonzentration durch die Macula densa eine Angiotensinfreisetzung durch Einwirkung von Renin auf Substrat in der Wand des *vas afferens* erfolgt und daß die Verminderung der Filtration (Tubulus-Kollaps) durch eine präglomeruläre Vasokonstriktion verursacht wird. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, daß diese offenbar Na-spezifische Reaktion an stark Renin-verarmten Nieren nur in geringem Maße auslösbar war.

Durch Untersuchungen an der Rattenniere von Cortney et al. (10) wurde die Hypothese, daß die Natriumkonzentration im Bereich der Macula densa ein Faktor für die Regulation des Glomerulumfiltrates ist, weiter unterstützt. Die Autoren perfundierten isolierte Henlesche Schleifen mit Natriumchloridlösung bei unterschiedlichen Stromstärken und fanden, daß mit steigender Perfusion die Natriumkonzentration im fröhdistalen Konvolut anstieg. Da die Hypothese von Thureau nicht mit allen pathologischen Veränderungen in Einklang zu bringen ist, versuchte Eigler (15), sie durch eine Zusatzhypothese zu erweitern.

So findet sich z.B. bei einseitiger Nierenarteriendrosselung eine vermehrte tubuläre Natrium- und Wasserrückresorption auf der stenosierte Seite. Es liegt also nahe, daß die Natriumkonzentration auch im Bereich der Macula densa vermindert ist, so daß der von Thureau vermutete Mechanismus nicht zustande kommen kann.

Eigler nimmt daher an, daß die Macula densa nicht auf Änderungen eines bestimmten Natriumgehaltes in der Tubulusflüssigkeit anspricht, sondern

auf den Quotienten aus der Natriumkonzentration im Plasma (Na_P) und in der Tubulusflüssigkeit (Na_{TF}). Wenn der Quotient aus der Natriumkonzentration des Plasmas und der Tubulusflüssigkeit im Bereich der Macula densa ($\text{Na}_P/\text{Na}_{TF}$) bei Erhöhung der frühdistalen Natriumkonzentration vermindert ist, kommt es nach Eiglers Ansicht zu einer vermehrten Reninaktivierung und zu einer lokalen Angiotensinwirkung mit Konstriktion des vas afferens und nachfolgender Verminderung der glomerulären Filtrationsrate.

Eine Erhöhung des Quotienten führt nach Eigler zu einer Reninsekretion ins Blut mit Freisetzung von Angiotensin im Kreislauf bei gleichzeitiger Blockierung der lokalen Reninwirkung im vas afferens.

Britton (4) hat eine Hypothese entwickelt, die sich mit der Beziehung zwischen Renin und der Autoregulation der Niere befaßt. Nach Ansicht des Autors kommt es bei einem Anstieg der Natriumkonzentration im frühdistalen Tubulus zur Freisetzung von Renin aus den Granula der juxtaglomerulären Zellen in deren Cytoplasma. Das Renin reagiert danach in der Wand der afferenten Arteriole mit dem Plasmaangiotensinogen und erhöht so den Arteriolentonus. Kommt es zu einer Abnahme der Natriumkonzentration an der Macula densa, so wird der Transport von Renin aus den Granula der juxtaglomerulären Zellen in die Wandzellen der afferenten Arteriole gehemmt und der Arteriolentonus verringert. Nach Anreicherung von Renin in den juxtaglomerulären Zellen wird es in die efferente Arteriole sezerniert. Somit steigt die Reninaktivität im strömenden Blut und führt so zu sekundären Veränderungen wie z.B. zu einer Stimulierung der Aldosteronsekretion.

4. Direkter Einfluß der Natrium-Ionenkonzentration auf die Renin-Substrat-Reaktion

Bumpus et al. konnten mit in vitro Versuchen zeigen, daß Renin und Substrat in Gegenwart von Natriumchlorid schneller reagieren (8).

Er inkubierte verschiedene Plasmaproben mit menschlichem Renin bei einem pH-Wert von 5,5 über vier Stunden in An- und Abwesenheit von Natriumchlorid. Die Menge des gebildeten Angiotensins (bei gleichen Versuchsbedingungen) stieg bei Anwesenheit von Natriumchlorid an. Außerdem konnte Bumpus zeigen, daß die minimale Substratkonzentration, bei der eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit mit endogenem Renin erzeugt wird, in Anwesenheit von Ionen höher als in ionenfreiem Milieu liegt. Der Verfasser erklärt diese Erhöhung der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit durch eine herabgesetzte "intermolekulare Wechselwirkung" zwischen Renin und Substrat mit anderen unspezifischen Plasmaproteinen. Durch die Anwesenheit von Ionen soll die Wechselwirkung von Renin und Substrat mit anderen unspezifischen Plasmaproteinen vermindert werden. Direkten Anstoß zu den Untersuchungen, deren Ergebnisse in dieser Arbeit vorgelegt werden, waren Untersuchungen von Dahlheim u. Mitarb. (11), der anhand seiner Ergebnisse eine Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Natriumkonzentration feststellen konnte.

Ein durch fraktionierte NaCl-Fällung, Sephadex-Gel-Filtration und Dichtegradientenzentrifugation angereichertes Angiotensinase-freies Reninsubstrat vom Schwein wurde mit Schweinerenin und Natriumchlorid bzw. Natriumbromid in verschiedenen Konzentrationen bei einer Temperatur von 37°C und einem pH-Wert von 6,8 inkubiert. Mit steigender Natriumkonzentration im Inkubationsmedium nimmt die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit nach Dahlheim unabhängig von den anwesenden Anionen ab. Der Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit ist bis zu einer Natriumkonzentration von 150 mÄq/l NaCl oder NaBr steil. Oberhalb dieser Ionenkonzentration nimmt die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit nur noch wenig ab.

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A) Begründung der Untersuchungen; Versuchsplan

Die zuvor erwähnten Untersuchungen lassen vermuten, daß das Ionenmilieu einen direkten Einfluß auf die Kinetik der Renin-Substrat-Reaktion hat.

Da es möglich ist, daß eine intrazelluläre Angiotensinbildung in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates stattfinden kann, ist die Frage interessant, ob Änderungen der Ionenkonzentration oder der intrazellulären Ionenstärke einen direkten Einfluß auf die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit und auf die Affinität zwischen Renin und Substrat haben.

Die Voraussetzung dieser Möglichkeit, daß intrazelluläres Renin mit Renin-Substrat in Kontakt kommt und daß Angiotensin I zu Angiotensin II convertiert wird, wurde in dieser Arbeit nicht geprüft. Um die vorn erwähnte interessante Frage zu lösen, wurden Bestimmungen 1. der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit aus der Renin-Substrat-Reaktion in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration und 2. der Michaeliskonstanten dieser Reaktion, d.h. die Substratkonzentration, bei der die Reaktion die halbe Maximalgeschwindigkeit besitzt, durchgeführt.

Das Prinzip aller durchgeführten Untersuchungen ist die Inkubation von Renin mit Reninsubstrat und die Testung des gebildeten Angiotensins an der Ratte.

Voraussetzungen für die reaktionskinetischen Untersuchungen in Abhängigkeit von der Natriumkonzentration und die Testung der Ergebnisse an der Ratte sind:

1. Vorhandensein eines Substrates, das
 - a) nach Inkubation mit Renin Angiotensin bildet,
 - b) keine Angiotensinaseaktivität und keine Beimengungen von Renin besitzt,
 - c) bei Inkubation ohne Zusatz von Enzym stabil ist,
 - d) eine hohe Konzentration besitzt, damit der prozentuale Umsatz

des Substrates während der Reaktion mit Renin gering ist und damit die Bedingungen für die Messung der Enzym-Aktivitäten nach Michaelis-Menten erfüllt sind.

2. Das benutzte Renin darf keine Angiotensinaseaktivität besitzen.
3. Die nach der Reaktion zwischen Renin und Substrat gebildeten Angiotensinmengen müssen in einer Größenordnung liegen, die im Blutdrucktest an der Ratte meßbar sind.

Alle verwendeten Substanzen (Substrat, Renin, Elektrolyte) wurden in einer 0,005 m Tris-Puffer-Lösung pH 7,4 gelöst bzw. gegen diese Lösung dialysiert (hergestellt nach den wissenschaftlichen Tabellen Documenta Geigy). Diese Pufferlösung ist natriumfrei, hat eine ausreichende Pufferkapazität bei minimaler Ionenstärke und eine H-Ionenkonzentration nahe dem Neutralpunkt.

B) Vorversuche

Da es wünschenswert ist, reaktionskinetische Untersuchungen in einem homologen System durchzuführen, wurde versucht, Renin und Reninsubstrat, die den weiter vorn angegebenen Kriterien genügten, von Ratten zu gewinnen.

Eine reninsubstrathaltige Fraktion von Rattenplasma wurde nach der Methode von Boucher et al. (1) präpariert und anschließend gegen die 0,005 m Tris-Puffer-Lösung pH 7,4 dialysiert.

Eine reninreiche Proteinfraktion aus Rattennieren wurde nach der Methode von Brown et al. (5) präpariert.

Ein Milliliter der Rattensubstratlösung enthielt nach der Inkubation bei 37° C mit einem Überschuß menschlichen Renins 575 ng-Äquivalente Angiotensin II (siehe Tab. 1).

Eine Überprüfung des Substrates auf den Gehalt an Angiotensinasen ergab, daß das Substrat noch nicht frei von Angiotensinaseaktivität war. Nach 12 Stunden Inkubation bei 37° C von 1 ml Substrat mit natürlichem Angioten-

sin II zeigte es sich, daß nach der Inkubation nur noch ca. 65 % des Angiotensin II wiedergewonnen werden konnten (Tab. 2).

Nach einer 12-Stunden-Inkubation der Substratlösung allein bei 37° C wurden ca. 12 ng-Äquivalente Angiotensin II gebildet. Da bei der Testung an der Ratte 0,2 ml injiziert werden, enthält das Substrat somit nur eine minimale Reninaktivität (Tab. 3).

Auch das Rattenrenin war nicht von Angiotensinasenaktivität befreit. Die 12-h-Inkubation bei 37° C von Renin mit natürlichem Angiotensin II ergab nach der Inkubation nur eine "Wiederfindungsrate" des Angiotensins von ca. 20 % (Tab. 3).

Rattenrenin selbst war frei von vasoaktiven Stoffen (Tab. 3).

Daraufhin wurde versucht, das nach Brown präparierte Rattenrenin noch zusätzlich durch die Methode von Haas und Goldblatt (23) von Angiotensinaseaktivität zu befreien. Die anschließende Überprüfung des Renins ergab jedoch ebenfalls noch eine starke Angiotensinaseaktivität (Tab. 4).

Da die Befreiung des Rattenrenins von Angiotensinasen nicht gelungen ist, wurden die weiteren Untersuchungen in heterologen Systemen durchgeführt, und zwar mit Rinder- bzw. Hammelsubstrat und menschlichem Renin.

C) Methodik der Hauptversuche

1. Messung von Angiotensin an der Ratte

Männliche Wistar-Ratten (Gewicht ca. 200 g) wurden in Pentobarbitalnarkose (i.p. appliziert) nephrektomiert.

18-24 Stunden später wurden sie in Urethannarkose (1,8 ml 20 % Urethanlösung i.m.) tracheotomiert und ein kurzes Stück eines PVC-Schlauches als Trachealkanüle eingelegt.

In die linke Arteria carotis communis wird ein mit 0,9 % NaCl-Lösung gefüllter PE 50 Polyäthylenkatheter eingeführt, eingebunden und über eine Glaskanüle mit einem Hg-Manometer verbunden. Somit kann der arterielle

Blutdruck der Ratte gemessen werden.

In die rechte Vena jugularis superficialis wird ebenfalls ein mit 0,9 % NaCl-Lösung gefüllter Polyäthylenkatheter eingeführt. Durch diesen Katheter werden die Testlösungen injiziert.

Die Empfindlichkeit der Ratte wird durch Injektionen in die Vena jugularis superficialis von je 0,2 ml einer Hypertensin-Standard-Lösung (Angiotensin II-Amid-Lösung, Hypertensin Ciba) 25, 50, 100 ng AT/ml und Nachspülen mit 0,1 ml einer 0,9 % NaCl-Lösung geprüft.

Sobald dosisproportionale Blutdrucksteigerungen, aufgezeichnet an einem Trommelkymographen mit Tintenschreiber, erreicht sind, kann mit der Testung begonnen werden.

Jede durch eine Blutdruckkurve gekennzeichnete unbekannte Probe (0,2 ml der Testlösung) wird mit einem vor und nach der Probe injizierten Standard (0,2 ml der Angiotensin II-Amid-Lösung) verglichen. Anschließend wird durch Interpolation zwischen diesen Standardwerten mit Hilfe der Dreisatzrechnung der genaue Wert der unbekannten Probe ermittelt. (Abb. 3)

<i>U₁</i>	<i>S₁₀</i>	<i>U₂</i>	<i>S₂₀</i>	<i>U₃</i>	<i>S₁₀</i>	injizierte Probe
<i>1,8</i>	<i>2,4</i>	<i>3,5</i>	<i>4,5</i>	<i>3,3</i>	<i>2,5</i>	RR-Anstieg (cm)
	<i>10</i>	<i>15,2</i>	<i>20</i>	<i>14</i>	<i>10</i>	errechnete Angiotensin-II-Menge (ng)



Abb. 3: Originalblutdruckmeßkurve
(U = unbekannte Probe; S = Standard (ng Hypertensin Ciba))

Alle mitgeteilten Meßergebnisse sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen an einer oder an verschiedenen Ratten.

Die mittlere prozentuale Differenz von Einzelmessungen und den Mittelwerten von Doppelbestimmungen wurde nach der Formel

$$\Delta \% = \frac{a - \left(\frac{a + b}{2} \right)}{\frac{a + b}{2}}$$

berechnet, wobei a und b die Einzelmessungen sind. Die Berechnung wurde mit 50 willkürlich ausgesuchten Doppelbestimmungen durchgeführt und ergab eine mittlere Abweichung der Einzelbestimmungen vom Mittelwert der Doppelbestimmungen von 4,1 % (0 % - 9,5 %) mit einer mittleren Standardabweichung von 2,7 %. Es kann angenommen werden, daß Unterschiede des Angiotensingehaltes zweier beliebiger Proben von mehr als 10 % (4,1 % + 2 × 2,7 % = 9,6 %) mit mehr als 95 %iger Wahrscheinlichkeit nicht auf zufällige Meßfehler zurückzuführen sind. Die Aussage im Ergebnisteil, daß ein Anstieg oder Abfall der Angiotensinbildung bei Änderung der Versuchsbedingungen vorliegt, orientiert sich an dieser Signifikanzgrenze.

2. Präparation von Renin und Substrat

a) Menschliches Renin (Methode von Brown et al. (5) und Haas et al. (24))

Nieren von verstorbenen Patienten ohne Nierenerkrankungen wurden von Fett- und Bindegewebe befreit, zerkleinert und durch einen Fleischwolf gedreht.

Das Nierenhomogenat wurde durch Gaze filtriert und durch Hinzufügen von Salzsäure unter ständigem Rühren im Kühlraum auf einen pH-Wert von 2,9 gebracht. Bei dieser H-Ionenkonzentration werden inerte Proteine und Angiotensinasen präzipitiert.

Zur Stabilisierung des Renins wurde unter Rühren Natriumchlorid (52 g/l) hinzugegeben, diese Lösung durch Watman Nr. 50 Papier filtriert und der Überstand in Visking Zellophanbeuteln gegen einen 0,005 m Na-Phosphat-Puffer pH 7,0 dialysiert.

Anschließend wurde diese Lösung bei Zimmertemperatur auf lose gepackte DEAE Zellulosesäulen, die mit 5 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 äquilibriert waren, aufgetragen. Dabei wird Renin adsorbiert. Nach Waschen der Säulen mit einem 0,03 m Phosphatpuffer pH 7,0 wurde Renin anschließend mit Hilfe eines 0,35 m Natriumphosphatpuffers vom pH-Wert 6,0 eluiert. Durch Dialyse des Eluates gegen einen 0,9 m NaCl-haltigen 0,1 m Glycin-HCl-Puffer pH 3,0 wurde dessen Angiotensinaseaktivität weiter reduziert. Das gebildete Präzipitat wurde durch Whatman Nr. 1 Papier filtriert und das Filtrat gegen den Inkubationspuffer (0,005 M Tris-Puffer pH 7,4) dialysiert. Da diese Lösung aber noch nicht frei von Angiotensinaseaktivität war, wurde versucht, diese Angiotensinasenaktivität durch die Methode von Haas und Goldblatt (24) weiter zu reduzieren.

Dazu wurde die Lösung mit Hilfe von 0,5 n NaOH auf einen pH-Wert von 9,1 gebracht. Anschließend wurde $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ bis zur 1,9 m Konzentration hinzugegeben und unter Rühren im Eisbad mit 20 % Trichloressigsäure ein pH-Wert von 2,8 eingestellt. Fünf Minuten später wurde die Lösung mit 0,5n NaOH neutralisiert. Die jetzt angiotensinasefreie Reninlösung wurde zuletzt mehrere Tage gegen den Inkubationspuffer (0,005 m Trispufferlösung pH 7,4) dialysiert.

b) Rindersubstrat und Konzentrierung (Methode von Lever et al. (32))

Citratblut vom Rind wurde zentrifugiert und zu dem erhaltenen Serum 90 g NaCl/l hinzugegeben. Das Serum wurde durch Zugabe von 6 n HCl auf pH 3,1 gebracht. Dabei entsteht ein schweres Präzipitat. Im Überstand verbleibt Substrat.

Celite 545 (Johns-Manville Co) wurde mit 1,5 m Kochsalzlösung, deren pH-Wert mit 6 n HCl auf 3,1 eingestellt ist, aufgeschwemmt, auf eine große Nutsche über Filterpapier aufgetragen und solange mit der sauren Kochsalzlösung äquilibriert, bis der Durchfluß einen pH-Wert von 3,1 besitzt.

Anschließend wurde der nach Zentrifugation erhaltene Überstand durch das Celite filtriert. Reninsubstrat wird abfiltriert, während inerte Proteine und Angiotensinasen von dem Celite zurückgehalten werden. Durch anschließende Erhöhung der Natriumchloridkonzentration im Filtrat auf eine Molarität von 2,5 präzipitiert das Reninsubstrat. Renin verbleibt im Überstand. Das gesamte Reninsubstrat enthaltene Präzipitat wird über große Nutschen abfiltriert, in 0,1 m Na_2HPO_4 gelöst und mehrere Tage gegen den Inkubationspuffer (0,005 m Trispuffer pH 7,4) dialysiert.

Die nach der Dialyse erhaltene Rindersubstratlösung wurde, um eine höhere Substratkonzentration zu erhalten, gefriertrocknet, anschließend in einer geringeren Menge Trispuffer pH 7,4 wieder aufgelöst und nochmals gegen 0,005 m Trispuffer dialysiert.

c) Hammelsubstrat und Konzentrierung (Methode von Skinner (45) und Methode von Lever et al. (32))

Ein Hammel wurde bilateral nephrektomiert und nach 7 Tagen entblutet. Das nach Zentrifugation erhaltene Plasma wurde gegen einen Na_2 -EdTA und NaCl enthaltenden Natriumphosphatpuffer pH 3,9 dialysiert.

Um die vorhandenen Angiotensinasen zu inaktivieren, wurde das Dialysat im Wasserbad auf 32°C erhitzt und nach nochmaligem Zentrifugieren der Überstand gegen einen Na_2 -EdTA und NaCl enthaltenden Natriumphosphatpuffer pH 7,5 dialysiert.

Da das Dialysat entgegen den Beschreibungen von Skinner (45) noch nicht frei von Angiotensinasenaktivität war, wurde versucht, durch Ansäuern in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen (Lever et al. (32)) die restliche

Angiotensinaseaktivität zu beseitigen.

Durch Hinzufügen von HCl in Gegenwart von 1,5 m NaCl wurde ein pH-Wert von 3,1 erreicht, bei dem durch isoelektrische Präzipitation inerte Plasmaproteine und noch vorhandene Angiotensinasen gefällt werden.

Anschließend wurde durch Erhöhung der Natriumchloridkonzentration das im Überstand befindliche Reninsubstrat präzipitiert. Das Sediment wurde nochmals in einer 2,5 m NaCl-Lösung gewaschen und nach Zentrifugation in einem Puffer pH 7,4 aufgelöst. Anschließend erfolgte in der Kühlkammer eine ausgiebige Dialyse gegen den Inkubationspuffer (Tris-Puffer pH 7,4 0,005 m).

Um eine höhere Substratkonzentration zu erhalten, wurde das Substrat nach der Dialyse ebenfalls gefriertrocknet, anschließend in einer geringeren Menge des 0,005 m Trispuffer pH 7,4 wieder aufgelöst und nochmals gegen diesen Puffer dialysiert.

3. Charakterisierung der Präparate

a) Bestimmung des Substratgehaltes

Das Prinzip der Substratgehaltbestimmung besteht darin, daß man 0,1 ml Substrat mit einem Überschuß von Renin versetzt, einige Stunden bei 37° C inkubiert und dann das nach dieser Reaktion entstandene Angiotensin (AT) an der Ratte testet. Nach dieser Methode ergaben sich für das Rindersubstrat ein Gehalt von 350 ng Äquivalenten Angiotensin II/ml^{x)} und für das Hammelsubstrat ein Gehalt von 418 ng Äquivalenten Angiotensin II. (Tab. 5 und 5) Die Messungen nach Konzentrierung der Substrate ergaben für das Rindersubstrat 1350 ng Äquivalente Angiotensin II/ml und für das Hammelsubstrat 1865 ng Äquivalente Angiotensin II/ml. (Tab. 7 und 8)

x) 1 ng Äquivalent Angiotensin II/ml (= ng Ä AT II/ml) entspricht dem Blutdruckanstieg an der Ratte, der durch Injektion von 1 ng/ml Hypertensin Ciba erzeugt wird.

Für die Untersuchungen mit Hilfe der Methode nach Boucher wurden folgende Substratkonzentrationen bestimmt: Rindersubstrat 304 ng Äquivalente Angiotensin II/ml; Hammelsubstrat 1890 ng Äquivalente Angiotensin II/ml. (Tab. 20 und 21)

b) Bestimmung der Angiotensinasenaktivität der Renin- und Substratpräparate

Rinder- bzw. Hammelsubstrat wurden bei 37° C mit natürlichem Angiotensin II für 8 bzw. 12 Stunden inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubation konnten ca. 100 % der hinzugefügten Menge Angiotensin II wiedergefunden werden. (Tab. 9, 10, 20 und 21)

Nach der Inkubation von menschlichem Renin mit natürlichem Angiotensin II bei 37° C im Wasserbad über 12 Stunden wurde die gleiche Menge Angiotensin II, die auch vor der Inkubation vorhanden war, wiedergefunden. (Tab. 11)

c) Bestimmung der Reninaktivität in den Substratlösungen

0,5 ml Rinder- bzw. Hammelsubstrat wurden mit Neomycin-Trispuffer-Lösung (zur Verhütung von Bakterienwachstum) bei 37° C im Wasserbad über 8 bzw. 12 Stunden inkubiert. (Tab. 9 und 10)

Die anschließenden Testungen an der Ratte ergaben, daß sich nach diesen Inkubationen je ca. 5 ng Äquivalente Angiotensin II/ml gebildet hatten. Diese minimale Reninaktivität kann vernachlässigt werden, da bei der Testung der Proben an der Ratte nur ein Fünftel dieses Volumens injiziert wird.

d) Zusammenfassende Charakterisierung der für die Hauptversuche verwendeten Substrat- und Reninpräparationen

Die für die folgenden Untersuchungen benutzten Substratpräparationen (Rindersubstrat, Hammelsubstrat) entsprechen den vorn angegebenen Kriterien. Die Substrate sind ohne Zusatz von Angiotensinaseninhibitoren frei von Angiotensinasenaktivität. Sie enthalten keine meßbare Reninaktivität. Renin ist ebenfalls frei von Angiotensinasenaktivität.

4. Methodik der Versuche zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit mit verschiedenen Ionen

a) Rindersubstrat

Die Untersuchungen wurden mit drei verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt. In der ersten Untersuchungsreihe betrug der Substratgehalt 1350 ng Äquivalente Angiotensin II, in der zweiten 350 ng Äquivalente Angiotensin II und in der dritten 117 ng Äquivalente Angiotensin II/ml. Das Inkubationsvolumen bestand jeweils aus 1,0 ml und setzte sich zusammen aus:

- 1) 0,05 ml menschlichem Renin,
- 2) 0,8 ml Rindersubstrat,
- 3) 0,05 ml einer 0,005 m Trispufferlösung pH 7,4,
- 4) 0,1 ml einer Elektrolytlösung (NaCl, NaBr oder Na₂SO₄), deren Ionenstärke^{x)} zwischen 0,06 und 1,5 variiert wurde.

Die Ionenstärke des gesamten Inkubationsansatzes variiert zwischen 0,006 und 0,15.

x) Die Ionenstärke (I) ist die halbe Summe der Produkte aus Ionenkonzentration und dem Quadrat der Ionenwertigkeit. Bezeichnet man die Konzentration der einzelnen Ionen mit c_i (M/l) und ihre Wertigkeit mit n_i , so ist

$$I = 1/2 \sum_i c_i \cdot n_i^2$$

Alle Ansätze wurden im Eisbad hergestellt, dann im Wasserbad bei 37°C 60 min. inkubiert und anschließend sofort eingefroren. Später wurden jeweils 0,2 ml dieser Proben an der Ratte getestet. (Tab. 13-15)

b) Hammelsubstrat

Die Untersuchungen wurden mit zwei Substratkonzentrationen durchgeführt (414 bzw. 138 ng Äquivalente Angiotensin II/ml). Das Volumen der Inkubationsansätze, die im Eisbad hergestellt wurden, betrug ebenfalls 1,0 ml und setzte sich zusammen aus:

- 1) 0,1 ml 1+4 mit Trispuffer verdünntem menschlichen Renin,
- 2) 0,8 ml Hammelsubstrat,
- 3) 0,1 ml einer Elektrolytlösung (NaCl , NaBr oder Na_2SO_4), deren Ionenstärke wiederum zwischen 0,06 und 1,5 variiert wurde.

Nachdem jeder Versuchsansatz bei 37°C 60 min. inkubiert worden war, wurden die Proben sofort eingefroren und später 0,2 ml davon an der Ratte getestet. (Tab. 16-17)

5. Methodik der Versuche zur Bestimmung der Michaeliskonstanten

a) Rinderssubstrat

Die Ausgangskonzentration des Rindersubstrates für die Bestimmung der Michaeliskonstanten betrug 1350 ng Äquivalente Angiotensin II/ml. Von dieser Substratlösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, so daß der Substratgehalt im späteren Versuchsansatz zwischen 1080 und 43 ng Äquivalenten Angiotensin II lag.

Die Untersuchungen wurden in NaCl -freiem Trispuffer sowie in Pufferlösungen mit drei verschiedenen Natriumkonzentrationen von 20, 60 oder 140 mM/l (Endkonzentration) durchgeführt. Der Versuchsansatz setzte sich zusammen aus:

- 1) 0,1 ml menschlichem Renin,
- 2) 0,1 ml einer 0,005 m Trispufferlösung oder NaCl-Lösung (200, 600
1400 mM/l) und
- 3) 0,8 ml der Verdünnungsreihe der Rindersubstratlösung.

Die Versuchsansätze wurden ebenfalls im Eisbad hergestellt, bei 37° C im Wasserbad 60 min. inkubiert und anschließend eingefroren. Später wurden jeweils 0,2 ml dieser Proben an der Ratte getestet. (Tab. 18)

b) Hammelsubstrat

Von der Ausgangskonzentration des Hammelssubstrates für die Bestimmung der Michaeliskonstanten, die 414 ng Äquivalente Angiotensin II/ml betrug, wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, so daß die Substratkonzentration im späteren Ansatz zwischen 331 und 21 ng Äquivalenten Angiotensin II variiert werden konnte.

Wie bereits unter 5.a) angegeben, wurden die Untersuchungen mit einer elektrolytfreien und drei NaCl-Lösungen verschiedener Molarität (20, 60, 140 mM/l Endkonzentration) durchgeführt. Die Versuchsansätze setzten sich zusammen aus:

- 1) 0,1 ml einer zuvor mit Trispufferlösung 1+4 verdünnten menschlichen Reninlösung,
- 2) 0,1 ml der 0,005 m Trispufferlösung pH 7,4 oder NaCl-Lösung (200, 600, 1400 mM/l) und
- 3) 0,8 ml der Verdünnungsreihe der Hammelssubstratlösung.

Die Versuchsansätze wurden im Eisbad hergestellt. Nach erfolgter Inkubation bei 37° C für 60 min. im Wasserbad wurden die Ansätze ebenfalls sofort eingefroren und später 0,2 ml jeder Probe an der Ratte getestet. (Tab. 19)

c) Rindersubstrat nach Boucher (1)

Das Volumen des Versuchsansatzes betrug 5,0 ml und setzte sich aus 4,0 ml Rindersubstratlösung, deren Gehalt zwischen 20 und 243 ng Äquivalenten Angiotensin II/ml Ansatz variierte, 0,5 ml Reninlösung (1+9 verdünnt) und je nach Versuchsbedingungen entweder aus 0,5 ml einer NaCl-freien Trispufferlösung pH 7,4 oder einer 1400 mM NaCl/l enthaltenen Trispufferlösung zusammen.

Die Versuchsansätze wurden mit einem Ionenaustauscher (Dowex 50X2 pH 6,0) versetzt und im Warburg Apparat unter Schütteln bei 37° C eine Stunde inkubiert. (Tab. 22)

Nach der Inkubation wurde das Gemisch in der Kühlkammer in Säulen gegeben, die bereits 1,0 ml Dowex-Harz (s.o.) enthielten. Durch Zugabe von 10 ml 0,2 n Ammoniumacetatlösung pH 6,0, 20 ml 10 %iger Essigsäure und 30 ml a. bidest. wurden die Proteine von der Säule entfernt. Angiotensin wurde anschließend mit Hilfe von 7,0 ml 0,1 n Diäthylamin und 7,0 ml 0,2 n Ammoniumhydroxyd eluiert.

Das erhaltene Eluat wurde gefriertrocknet, danach in 1,0 ml 0,005 m Trispuffer gelöst und 0,2 ml davon an der Ratte getestet.

d) Hammelsubstrat nach Boucher (1)

Die Ausgangskonzentration des Hammelssubstrats betrug 756 ng Äquivalente Angiotensin II/ml Ansatz. Sie wurde zwischen 16 und 756 ng Äquivalenten Angiotensin II/ml Ansatz variiert.

Das Volumen des Inkubationsgemisches betrug 5,0 ml und setzte sich aus 4,0 ml Substratlösung, 0,5 ml der Reninlösung (1+9 verdünnt) und 0,5 ml einer 1400 mM/l NaCl-Lösung in Trispuffer bzw. NaCl-freiem Trispuffer zusammen. (Tab. 23) Nach einer Inkubation mit Dowex-Harz (s.o.) bei 37° C über 60 min. wurden die Inkubationsgemische ebenfalls in der Kühlkammer nach der oben beschriebenen Methode behandelt, gefriertrocknet und an der Ratte getestet.

Abhängigkeit der Angiotensinbildung von der Zeit

0,1 ml menschliches Renin wurde mit 4,0 ml Rindersubstrat versetzt und mit Trispuffer auf ein Gesamtvolumen von 5,0 ml gebracht (Substratkonzentration ca. 280 ngÄ AT/ml Ansatz). Nach 1, 2, 3, 4 und 8 Stunden Inkubation im Wasserbad bei 37° C wurde jeweils 1,0 ml Inkubationsgemisch entnommen und an der Ratte getestet. (Tab. 12)

Bis zu 240 min. Inkubation verläuft die Angiotensinbildung linear abhängig von der Zeit. (Abb. 4)

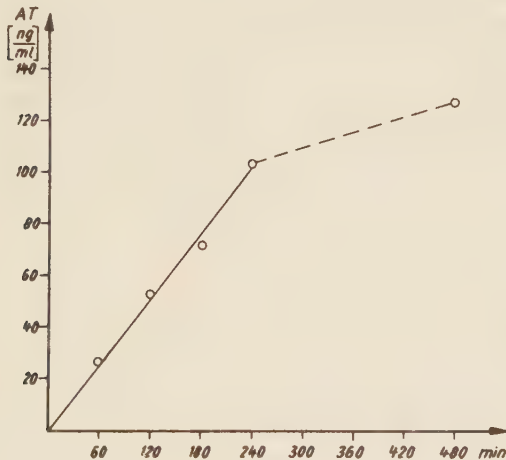


Abb. 4: Abhängigkeit der Angiotensinbildung von der Zeit (unter den Versuchsbedingungen (siehe Text) ist die Geschwindigkeit der Angiotensinbildung bis zu 4 h Inkubation konstant).

III. ERGEBNISSE

1. Einfluß von Natriumsalzen auf die Renin-Substrat-Reaktion

a) Rindersubstrat

Bei Verwendung einer Rindersubstratkonzentration von ca. 117 ng Äquivalenten Angiotensin II im Inkubationsmedium nimmt die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit bei Anwesenheit von NaCl- und Na₂SO₄-Salzen bis zu einer Ionenstärke von 0,012 leicht zu und erreicht zwischen Ionenstärken von 0,012 - 0,03 für NaCl und Na₂SO₄ ein Maximum. Mit weiter steigender Ionenstärke fällt die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit nach erreichtem Maximum bei Anwesenheit von NaCl- und Na₂SO₄-Salzen im Inkubationsgemisch wieder ab. Bei Zusatz von Natriumbromid zum Inkubationsmedium ist keine Änderung der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Ionenstärke zu erkennen. (siehe Abb. 5)

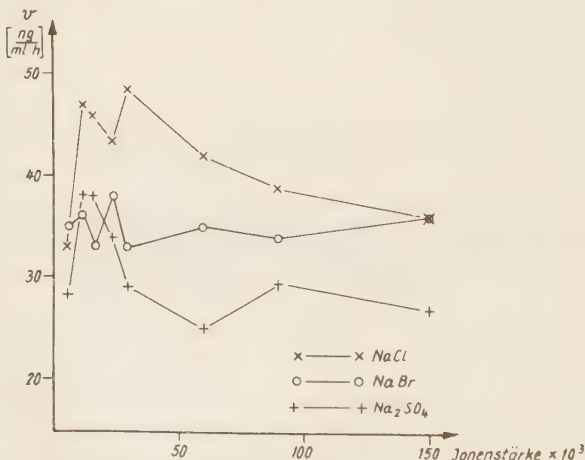


Abb. 5: Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Ionenstärke der Inkubationsmedien in Anwesenheit verschiedener Natriumsalze (Rindersubstratkonzentration ca. 117 ngÄ AT/ml Inkubationsansatz)

Bei einer Substratkonzentration von ca. 350 ng Äquivalenten Angiotensin II/ml Inkubationsmedium erkennt man, daß die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit bei Verwendung von Natriumsulfat zwischen den Ionenstärken 0,012 und 0,03 ein Maximum erreicht und dann mit zunehmender Ionenstärke wieder etwas abfällt.

Die übrigen Natriumsalze (NaCl, NaBr) verhalten sich unterschiedlich. Bei Anwesenheit von Natriumchlorid im Inkubationsmedium erkennt man bis zu einer Ionenstärke von 0,06 ein Plateau. Oberhalb dieser Ionenstärke fällt die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit wieder ab. Bei Zusatz von Natriumbromid zum Inkubationsmedium ist ein Plateau bis 0,024 und ein Abfall der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit oberhalb dieser Ionenstärke zu erkennen. (siehe Abb. 6)

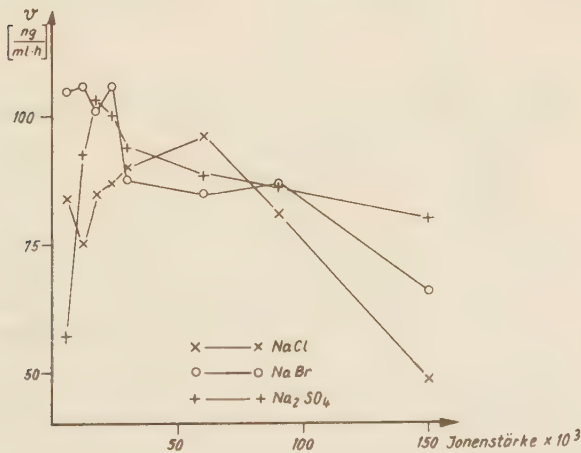


Abb. 6: Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Ionenstärke der Inkubationsmedien in Anwesenheit verschiedener Natriumsalze (Rindersubstratkonzentration 350 ngÄ AT/ml Inkubationsmedium).

Bei Verwendung einer Substratkonzentration von ca. 1350 ng Äquivalenten Angiotensin II/ml Inkubationsmedium fällt die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit bis zu einer Ionenstärke von 0,018 für Natriumbromidionen ab, steigt dann langsam an und erreicht ab 0,03 ein Plateau. In Anwesenheit von Natriumsulfationen erreicht die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit zwischen Ionenstärken von 0,024 und 0,06 ein angedeutetes Maximum, um bei höheren Ionenstärken wieder leicht abzufallen. Bei Verwendung von NaCl als Inkubationsmedium ist ein langsamer Anstieg bis zu einer Ionenstärke von 0,09 zu erkennen. (Abb. 7)

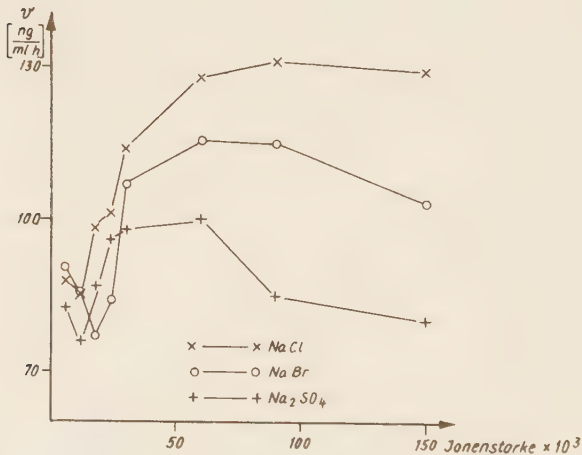


Abb. 7: Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Ionenstärke der Inkubationsmedien in Anwesenheit verschiedener Natriumsalze (Rindersubstratkonzentration 1350 ngÄ AT/ml Inkubationsmedium).

In den folgenden drei Abbildungen sind die Ergebnisse der Angiotensinbildung in Abhängigkeit von der Ionenstärke für ein einzelnes Natriumsalz bei Verwendung verschiedener Rindersubstratkonzentrationen aufgetragen.

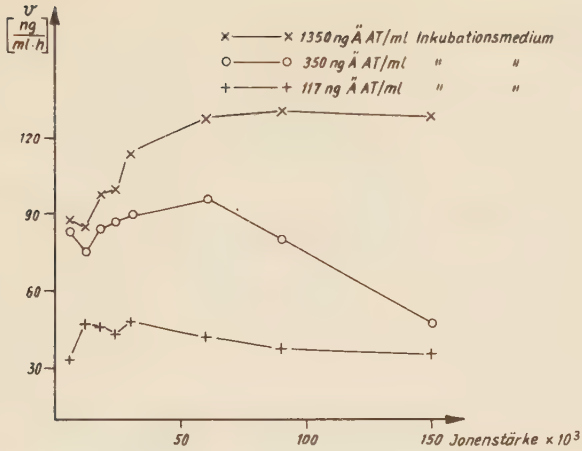


Abb. 8: Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Ionenstärke des Inkubationsmediums bei Anwesenheit von Natriumchlorid (Rindersubstrat).

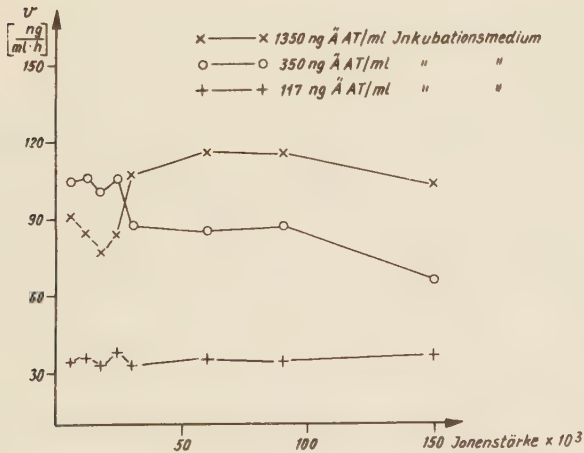


Abb. 9: Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Ionenstärke des Inkubationsmediums bei Anwesenheit von Natriumbromid (Rindersubstrat).

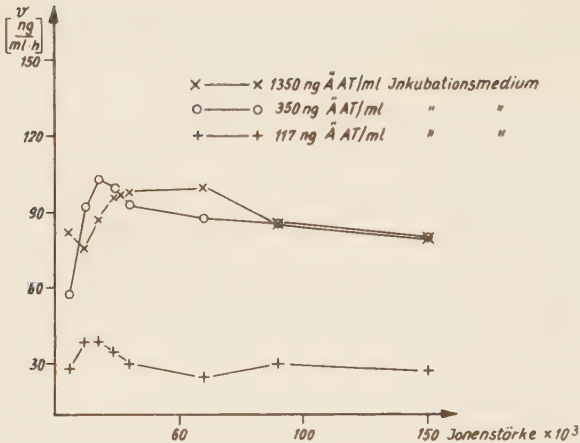


Abb. 10: Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Ionenstärke des Inkubationsmediums bei Anwesenheit von Natriumsulfat (Rindersubstrat).

Faßt man diese Ergebnisse zusammen, so zeigen sich bei den verschiedenen Rindersubstratkonzentrationen folgende Tendenzen:

1) Für ca. 117 ngÄ AT/ml Inkubationsmedium:

Bei Anwesenheit von NaCl und Na_2SO_4 leichter Anstieg der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit zwischen Ionenstärken von 0,006 und 0,012, Maximum bei einer Ionenstärke von 0,012 bis 0,03, Abnahme der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit bei größeren Ionenstärken. Keine Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der unterschiedlichen Ionenstärke bei Verwendung von NaBr.

2) Für ca. 350 ngÄ AT/ml Inkubationsmedium:

Ein deutliches Maximum der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit zwischen Ionenstärken von 0,012 und 0,03 für Na_2SO_4 ; bei Anwesenheit von NaBr ein Plateau bis 0,024 und von NaCl ein Plateau bis 0,06;

bei Anwesenheit von NaBr und Na_2SO_4 eine Abnahme der Angiotensinbildungs-
geschwindigkeit oberhalb einer Ionenstärke von 0,03;

mit NaCl im Inkubationsmedium ein Abfall der Angiotensinbildungsge-
schwindigkeit oberhalb einer Ionenstärke von 0,06.

3) Für ca. 1350 ngÄ AT/ml Inkubationsmedium:

Bei Anwesenheit von NaBr im Inkubationsmedium Abfall der Angiotensinbil-
dungsgeschwindigkeit bis zu einer Ionenstärke von 0,018,

langsameres Ansteigen mit Plateaubildung bei einer Ionenstärke von 0,03;

mit Na_2SO_4 im Inkubationsmedium angedeutetes Maximum zwischen Ionen-
stärken von 0,024 und 0,06 sowie Abfall der Angiotensinbildungsgeschwin-
digkeit oberhalb dieser Ionenstärke;

bei Anwesenheit von NaCl im Inkubationsmedium Anstieg der Angiotensin-
bildungsgeschwindigkeit bis zu einer Ionenstärke von 0,09.

b) Hammelsubstrat

Bei der Verwendung einer 138 ng Äquivalenten Angiotensin II/ml entspre-
chenden Substratkonzentration im Inkubationsmedium steigt die Angioten-
sinbildungsgeschwindigkeit bis zu einer Ionenstärke von 0,012 in Anwesen-
heit von Natriumchlorid an und erreicht zwischen 0,012 und 0,03 ein Maxi-
mum, während in Anwesenheit von Natriumbromid und Natriumsulfat bis zu
einer Ionenstärke von 0,06 bzw. 0,024 ein Plateau zu erkennen ist. Ober-
halb dieser Werte fällt die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit mit steigen-
der Ionenstärke des Inkubationsmediums für alle verwendeten Elektrolyte
leicht ab. Bei Verwendung einer Substratkonzentration von 414 ng Äquiva-
lenten Angiotensin II/ml steigt die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit bei
Anwesenheit von NaBr im Inkubationsmedium bis zu einer Ionenstärke von
0,024 und von Na_2SO_4 bis zu einer Ionenstärke von 0,018 an. Bei größeren
Ionenstärken fällt die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit für diese Natri-
umsalze wieder ab. Mit NaCl im Inkubationsmedium ist bis zu einer Ionen-
stärke von 0,06 ein Plateau zu erkennen. Oberhalb dieser Ionenstärke fällt

die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit ebenfalls wieder ab. (siehe Abb. 11 und 12)

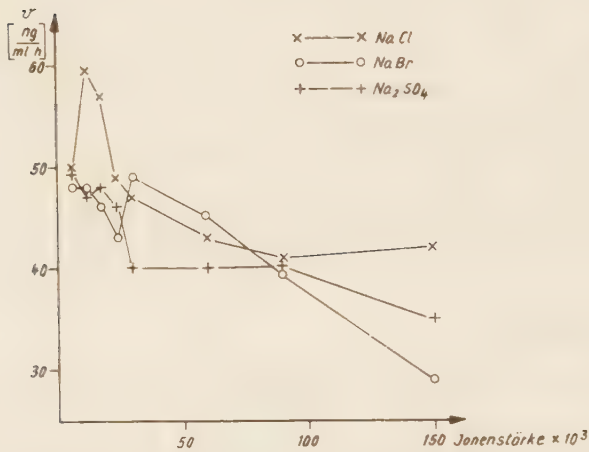


Abb. 11: Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Ionenstärke der Inkubationsmedien in Anwesenheit verschiedener Natriumsalze (Hammelsubstratkonzentration ca. 138 ngÄ AT/ml Inkubationsmedium)

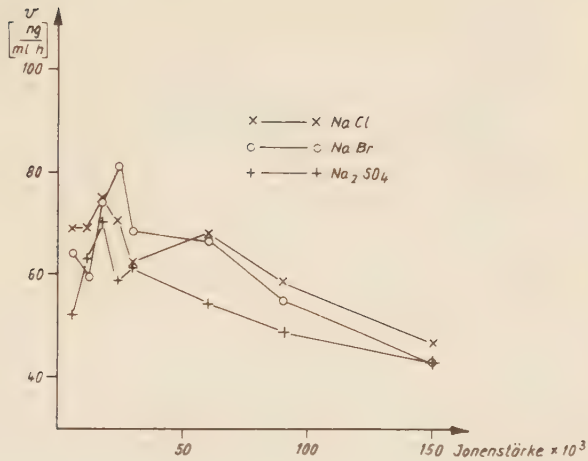


Abb. 12: Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Ionenstärke der Inkubationsmedien in Anwesenheit verschiedener Natriumsalze (Hammelsubstratkonzentration ca. 414 ngÄ AT/ml Inkubationsmedium).

Besonders deutlich ist die Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Ionenstärke des Inkubationsmediums in Abb. 13-15 zu erkennen, wo jeweils die Abhängigkeit der Angiotensinbildung von der Ionenstärke des Inkubationsmediums bei Anwesenheit eines einzelnen Natriumsalzes aufgetragen ist.

Abbildungen siehe umseitig

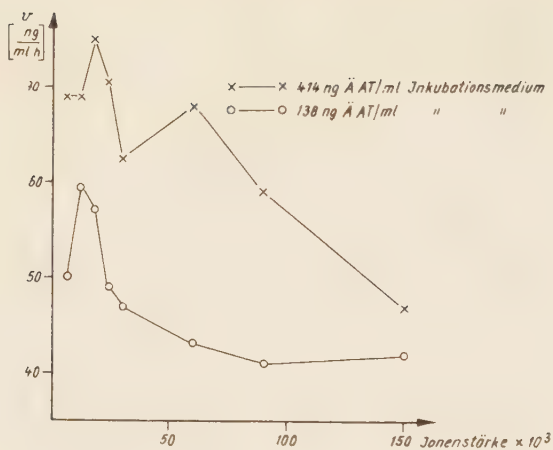


Abb. 13: Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Ionenstärke des Inkubationsmediums bei Anwesenheit von NaCl (Hammelsubstrat)

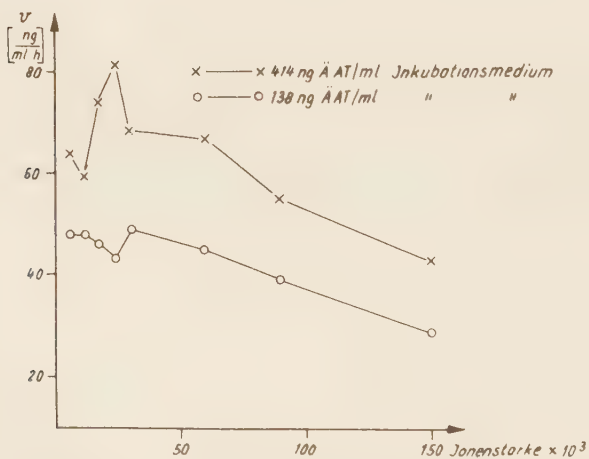


Abb. 14: Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Ionenstärke des Inkubationsmediums bei Anwesenheit von NaBr (Hammelsubstrat)

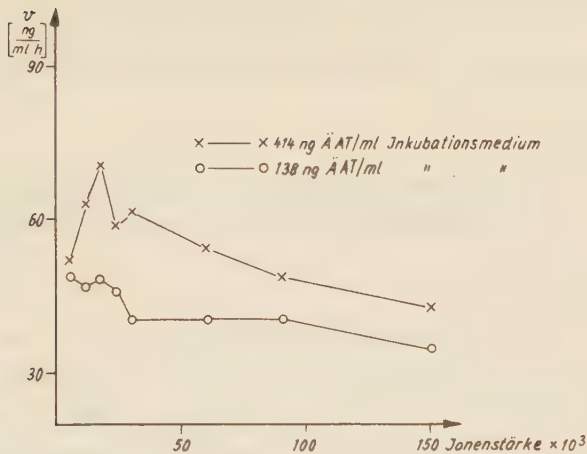


Abb. 15: Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Ionenstärke des Inkubationsmediums bei Anwesenheit von Na_2SO_4 (Hammelsubstrat)

Faßt man diese Ergebnisse zusammen, so zeigen sich bei den verschiedenen Hammelsubstratkonzentrationen folgende Tendenzen:

1) Für ca. 138 ngÄ AT/ml Inkubationsmedium:

Bei Anwesenheit von NaCl ein Anstieg der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit bis zu einer Ionenstärke von 0,012,

Maximum zwischen Ionenstärken von 0,012 und 0,03 und Abfall oberhalb dieser Ionenstärke.

Mit NaBr und Na_2SO_4 im Inkubationsmedium Plateaubildung bis zu einer Ionenstärke von 0,06 bzw. 0,024,

Abfall der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit bei größeren Ionenstärken.

2) Für ca. 414 ngÄ AT/ml Inkubationsmedium:

Bei Anwesenheit von NaBr und Na_2SO_4 Anstieg der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit bis zu Ionenstärken von 0,024 bzw. 0,018,

Abfall der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit bei größeren Ionenstärken;

mit NaCl im Inkubationsmedium Plateaubildung bis zu einer Ionenstärke von 0,06,

Abfall der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit oberhalb dieser Ionenstärke.

2. Bestimmung der Michaeliskonstanten bei verschiedenen Elektrolyt- konzentrationen für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und Rindersubstrat.

Zur Bestimmung der Michaeliskonstanten wurde die Gleichung nach Lineweaver-Burk benutzt (33). Dazu wurde auf der Abszisse der reziproke Wert der Substratkonzentration, auf der Ordinate der entsprechende reziproke Wert der gemessenen Angiotensinmenge aufgetragen und anschließend nach dem Prinzip der kleinsten Quadrate die Ausgleichsgerade ermittelt (22). Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der Abszisse ergibt den negativ reziproken Wert der Michaeliskonstanten.

Mit Hilfe dieser Methode wurden Werte ermittelt, die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt sind.

Tabelle 1

<i>NaCl (mM/l)</i>	<i>k_M-Wert (ng/ml)</i>
<i>0</i>	<i>ca. 300</i>
<i>20</i>	<i>ca. 300</i>
<i>60</i>	<i>ca. 380</i>
<i>140</i>	<i>ca. 210</i>

Aus der Tabelle 1 ist ersichtlich, daß bei der höchsten Natriumkonzentration (140 mM/l) die Michaeliskonstante kleiner wird, während der k_M-Wert bei einer Natriumkonzentration von 60 mM/l größer als der Kontrollwert (NaCl-freies Medium) und auch größer als der Wert, der bei einer

Natriumchloridkonzentration von 20 mM/l gemessen wurde, ist.

In den folgenden Abbildungen (Abb. 16-19) sind die gemessenen Ergebnisse graphisch dargestellt. (Meßwerte siehe Tab. 18)

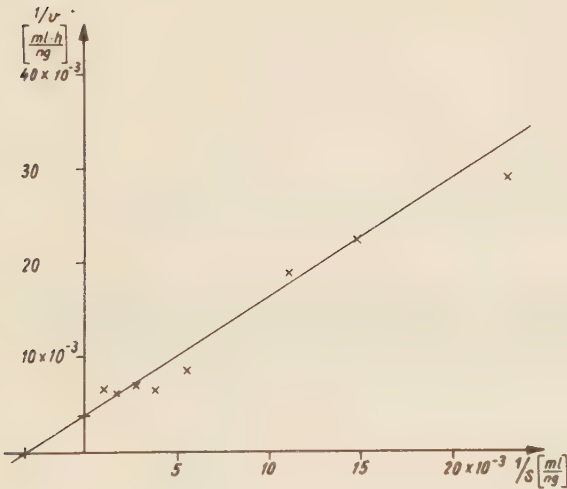


Abb. 16: Abhängigkeit der reziproken Angiotensinbildungsgeschwindigkeit ($1/v$) von der reziproken Rindersubstratkonzentration ($1/S$) in elektrolytfreiem Milieu (Auftragung nach Lineweaver-Burk)

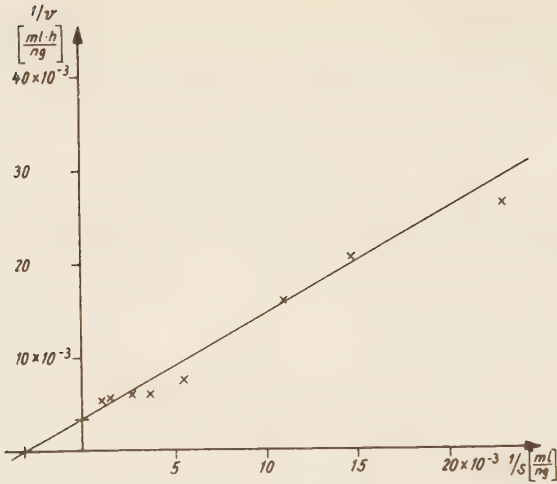


Abb. 17: Abhängigkeit der reziproken Angiotensinbildungsgeschwindigkeit ($1/v$) von der reziproken Rindersubstratkonzentration ($1/S$) bei Anwesenheit von 20 mM/l NaCl im Ansatz (Auftragung nach Lineweaver-Burk)

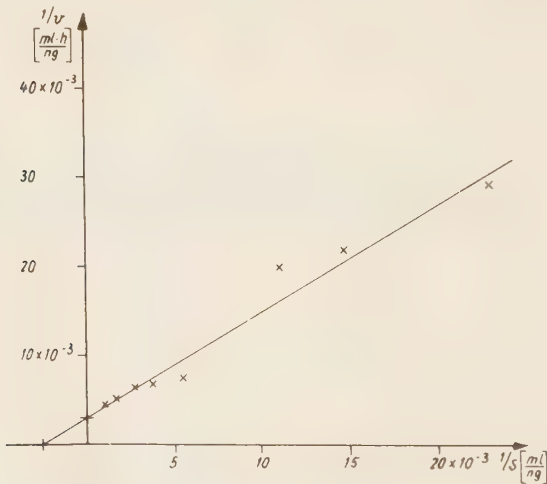


Abb. 18: Abhängigkeit der reziproken Angiotensinbildungsgeschwindigkeit ($1/v$) von der reziproken Rindersubstratkonzentration ($1/S$) bei Anwesenheit von 60 mM/l NaCl im Ansatz (Auftragung nach Lineweaver-Burk)

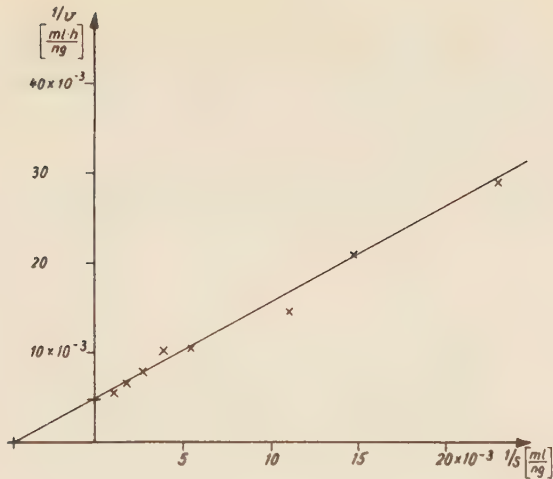


Abb. 19: Abhängigkeit der reziproken Angiotensinbildungsgeschwindigkeit ($1/v$) von der reziproken Rindersubstratkonzentration ($1/S$) bei Anwesenheit von 140 mM/l NaCl im Ansatz (Auftragung nach Lineweaver-Burk)

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse noch einmal zusammen aufgetragen:

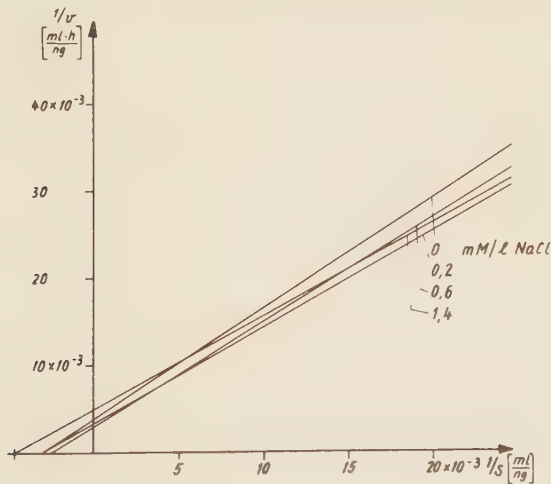


Abb. 20: Abhängigkeit der reziproken Angiotensinbildungsgeschwindigkeit ($1/v$) von der reziproken Rindersubstratkonzentration ($1/S$) in An- und Abwesenheit von Natriumsalzen (Auftragung nach Lineweaver-Burk)

2.b) Bestimmung der Michaeliskonstanten für die Reaktion zwischen
menschlichem Renin und Hammelsubstrat bei verschiedenen
Elektrolytkonzentrationen

Die Ergebnisse dieser Versuche, die nach dem gleichen Prinzip wie die mit Rindersubstrat durchgeführt wurden, sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

<i>Na Cl (mM/l)</i>	<i>k_M-Wert (ng/ml)</i>
<i>0</i>	<i>ca. 233</i>
<i>20</i>	<i>ca. 180</i>
<i>60</i>	<i>ca. 146</i>
<i>140</i>	<i>ca. 150</i>

Man kann wiederum erkennen, daß die Änderungen der Michaeliskonstanten in die gleiche Richtung weisen wie bei den Versuchen mit Rindersubstrat. Die Werte werden mit zunehmender Natriumchloridkonzentration im Inkubationsansatz kleiner. Die biphasische Veränderung wie bei Rindersubstrat ist nicht nachweisbar.

Die folgenden Abbildungen (21-25) stellen die Versuchsergebnisse graphisch dar.

siehe umseitig

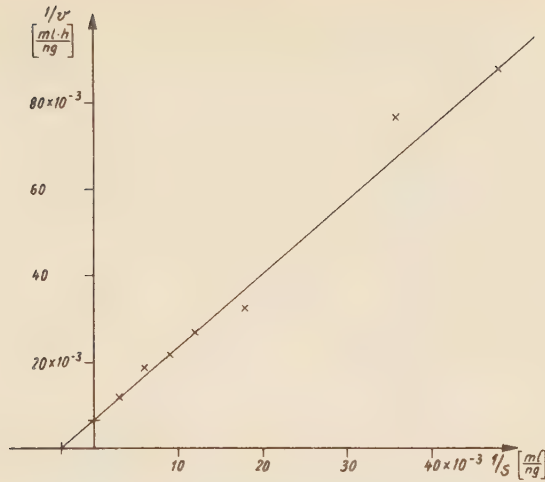


Abb. 21: Abhängigkeit der reziproken Angiotensinbildungsgeschwindigkeit ($1/v$) von der reziproken Hamme!substratkonzentration ($1/S$) in elektrolytfreiem Milieu (Auftragung nach Lineweaver-Burk)

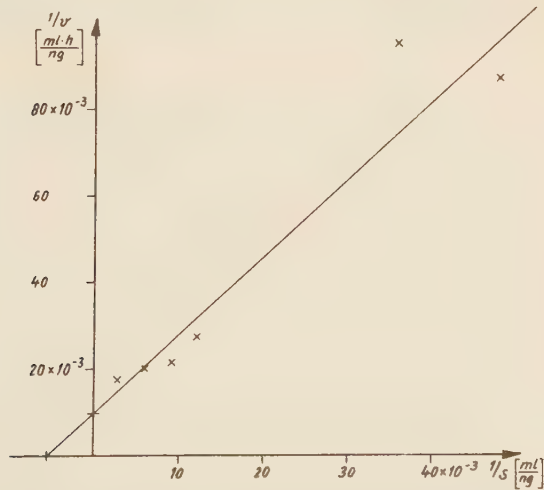


Abb. 22: Abhängigkeit der reziproken Angiotensinbildungsgeschwindigkeit ($1/v$) von der reziproken Hammelsubstratkonzentration ($1/S$) bei Anwesenheit von 20 mM/l NaCl im Ansatz (Auftragung nach Lineweaver-Burk)

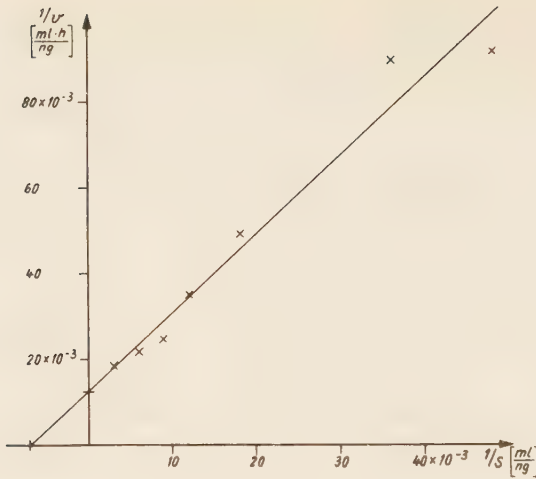


Abb. 23: Abhängigkeit der reziproken Angiotensinbildungsgeschwindigkeit ($1/v$) von der reziproken Hammelsubstratkonzentration ($1/S$) bei Anwesenheit von 60 mM/l NaCl im Ansatz (Auftragung nach Lineweaver-Burk)

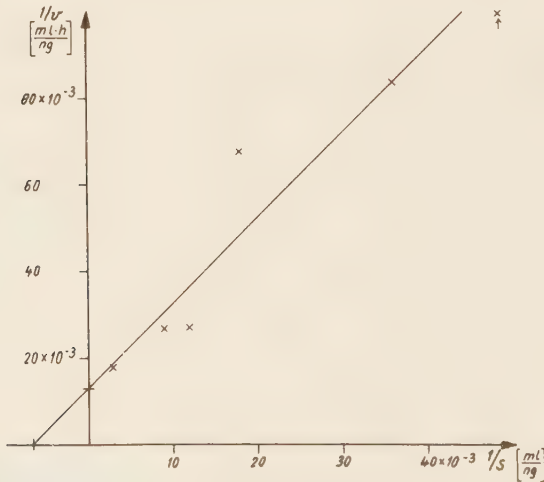


Abb. 24: Abhängigkeit der reziproken Angiotensinbildungsgeschwindigkeit ($1/v$) von der reziproken Hammelsubstratkonzentration ($1/S$) bei Anwesenheit von 140 mM/l NaCl im Ansatz (Auftragung nach Lineweaver-Burk)

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse zusammen aufgetragen:

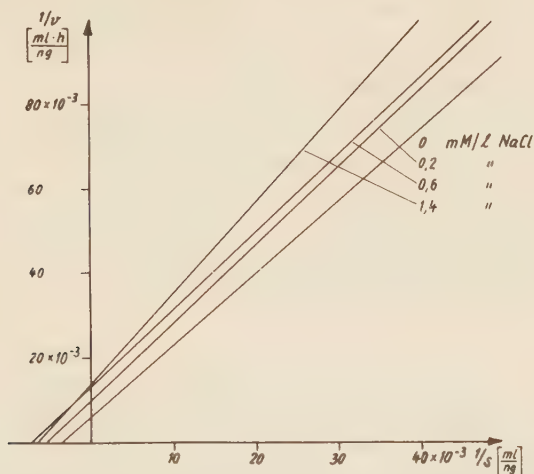


Abb. 25: Abhängigkeit der reziproken Angiotensinbildungsgeschwindigkeit ($1/v$) von der reziproken Hammelsubstratkonzentration in An- und Abwesenheit von Natriumsalzen (Auftragung nach Lineweaver-Burk)

Bei den vorher beschriebenen k_M -Bestimmungen für Rinder- bzw. Hammelsubstrat mit menschlichem Renin bei verschiedenen Elektrolytkonzentrationen lagen die Substratumsätze bei niedriger Substratkonzentration im Ansatz teilweise über 30 %, so daß die Bedingung einer konstanten Substratkonzentration nach Michaelis-Menten nicht mehr exakt erfüllt war.

Auf der anderen Seite müssen die nach der Reaktion zwischen Renin und Substrat entstandenen Angiotensin II-Mengen so groß sein, daß die Ratte eine meßbare Blutdrucksteigerung erfährt und daß diese Blutdrucksteigerung am Kymographen gemessen werden kann. Ein Beispiel soll das näher erklären: Der Versuchsansatz enthält z.B. 30 ng Äquivalente Angiotensin II/ml. Wenn der Substratumsatz 10 % beträgt, entstehen 3 ng Äquivalente Angiotensin II/ml. Da jedoch davon nur 0,2 ml zur Testung an der Ratte herangezo-

gen werden, ist die Angiotensinmenge so gering, daß eine Blutdruckmessung nicht mehr möglich ist. Von diesen Gesichtspunkten ausgehend, wurden unter Zuhilfenahme der bereits beschriebenen Methode nach Boucher (1) erneut K_M -Bestimmungen durchgeführt.

Mit dieser Methode gelingt es, durch Inkubation eines größeren Volumens und anschließender Konzentrierung des Eluates geringere Konzentrationen des entstandenen Angiotensins im Inkubationsansatz an der Ratte zu testen und den Substratumsatz dabei unter 15 % zu halten, so daß der Substratgehalt als praktisch konstant angesehen werden kann.

2.c) Bestimmung der Michaeliskonstanten für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und Rindersubstrat bei verschiedenen Elektrolytkonzentrationen (Mikromethode nach Boucher)

Die verwendeten Substratausgangskonzentrationen lagen zwischen 20 und 243 ng Äquivalenten Angiotensin II/ml Ansatz. Bei sämtlichen Messungen lagen die Substratumsätze nach der Reaktion zwischen Renin und Substrat unter 10 %.

In Tabelle 3 sind die so bestimmten Werte der Michaeliskonstanten zusammengestellt.

Tabelle 3

<i>NaCl (mM/l)</i>	<i>k_M-Wert (ng/ml)</i>
<i>0</i>	<i>ca. 69</i>
<i>140</i>	<i>ca. 56</i>

Wie aus der obigen Tabelle zu entnehmen ist, ist in Übereinstimmung mit den bereits beschriebenen Ergebnissen wiederum eine Abnahme der Michaeliskonstanten im NaCl-haltigen Ansatz erkennbar.

Abbildungen 26-28 zeigen die graphische Darstellung der Meßergebnisse.

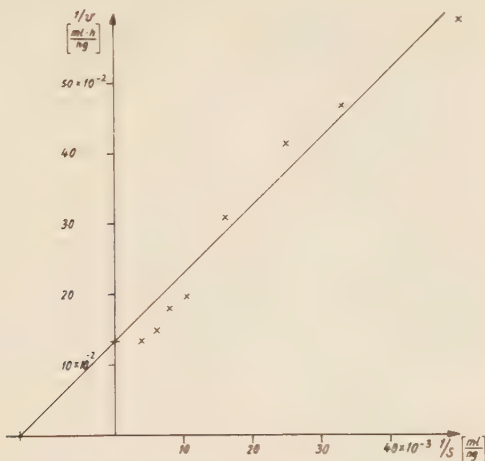


Abb. 26: Abhängigkeit der reziproken Angiotensinbildungsgeschwindigkeit ($1/v$) von der reziproken Rindersubstratkonzentration ($1/S$) in elektrolytfreiem Milieu (Auftragung nach Lineweaver-Burk)

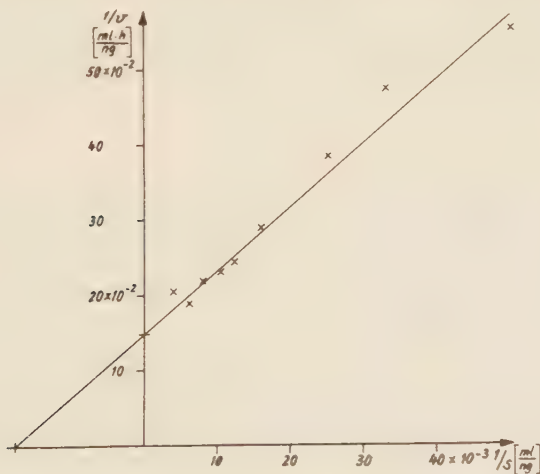


Abb. 27: Abhängigkeit der reziproken Angiotensinbildungsgeschwindigkeit ($1/v$) von der reziproken Rindersubstratkonzentration ($1/S$) in Anwesenheit von 140 mM/l NaCl im Ansatz (Auftragung nach Lineweaver-Burk)

In Abbildung 28 sind die gemessenen Ergebnisse in An- und Abwesenheit von Elektrolyten gemeinsam aufgetragen.

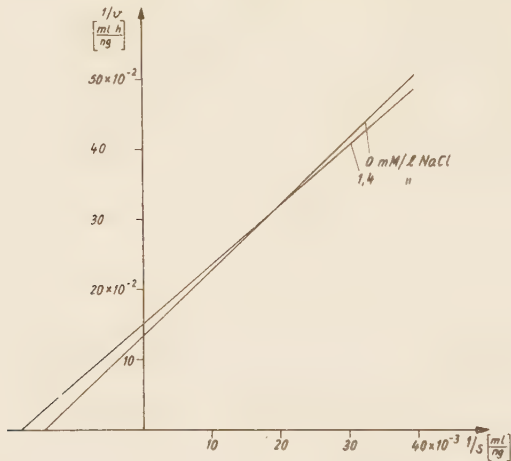


Abb. 28: Abhängigkeit der reziproken Angiotensinbildungsgeschwindigkeit ($1/v$) von der reziproken Rindersubstratkonzentration ($1/S$) in An- und Abwesenheit von Natriumsalzen (Auftragung nach Lineweaver-Burk)

2.d) Bestimmung der Michaeliskonstanten für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und Hammelsubstrat bei verschiedenen Elektrolytkonzentrationen (Mikromethode nach Boucher)

Der Substratgehalt wurde zwischen 16 und 756 ng Äquivalenten Angiotensin II/ml Ansatz variiert. Die Substratumsätze betrugen nach einer Stunde Inkubation maximal 15 %. Tabelle 4 zeigt die ermittelten Werte der Michaeliskonstanten.

Tabelle 4

<i>Na Cl (mM/l)</i>	<i>k_M-Wert (ng/ml)</i>
<i>0</i>	<i>ca. 160</i>
<i>140</i>	<i>ca. 137</i>

Auch in diesen Versuchen ist die Michaeliskonstante in Anwesenheit von Natriumchlorid im Inkubationsgemisch wieder erniedrigt. In Abbildung 29 und 30 sind die Meßergebnisse einzeln graphisch dargestellt, in Abbildung 31 noch einmal zusammengefaßt.

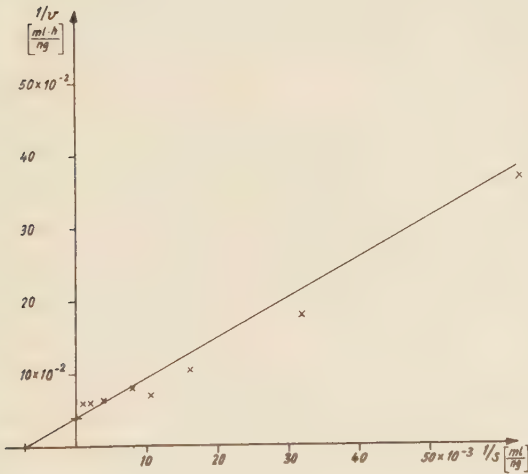


Abb. 29: Abhängigkeit der reziproken Angiotensinbildungsgeschwindigkeit ($1/v$) von der reziproken Hammelsubstratkonzentration ($1/S$) ohne Zusatz von NaCl (Auftragung nach Lineweaver-Burk)

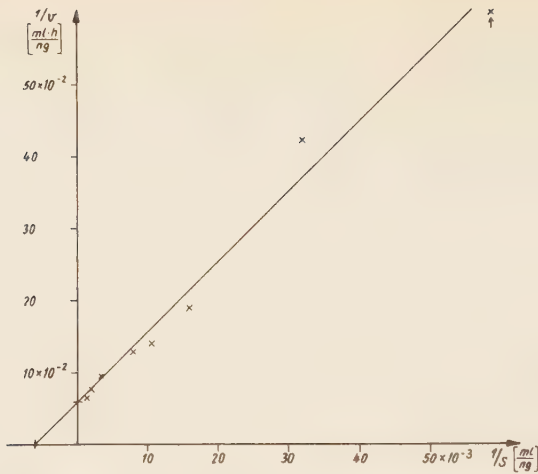


Abb. 30: Abhängigkeit der reziproken Angiotensinbildungsgeschwindigkeit ($1/v$) von der reziproken Hammelsubstratkonzentration ($1/S$) bei Anwesenheit von 140 mM/l NaCl im Ansatz (Auftragung nach Lineweaver-Burk)

In Abbildung 31 sind die Ergebnisse zusammen aufgetragen.

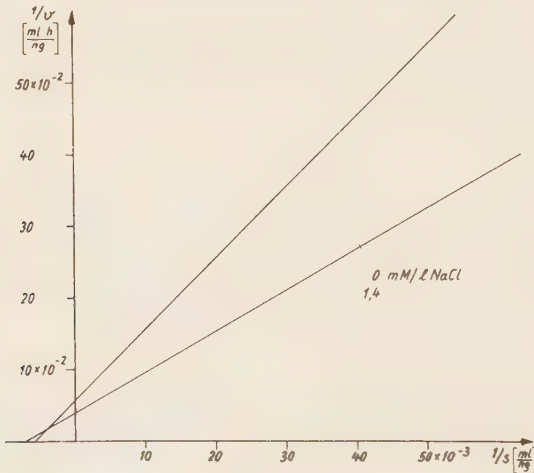
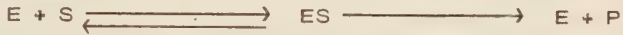


Abb. 31: Abhängigkeit der reziproken Angiotensinbildungsgeschwindigkeit ($1/v$) von der reziproken Hammelsubstratkonzentration ($1/S$) in An- und Abwesenheit von Natriumsalzen (Auftragung nach Lineweaver-Burk)

IV. DISKUSSION

Renin ist, wie bereits beschrieben, ein proteolytisches Ferment und bildet aus Angiotensinogen Angiotensin.

Man kann die Reaktion zwischen Renin und Angiotensinogen auch folgendermaßen formulieren:



E = Enzym; S = Substrat = Angiotensinogen; ES = Enzymsubstratkomplex;
P = Produkt = Angiotensin

Michaelis und Menten (34) haben vorausgesetzt, daß die Reaktion $ES \xrightarrow{\hspace{1.5cm}} E + P$ geschwindigkeitsbestimmend ist, also wesentlich langsamer als die Bildung des Enzymsubstratkomplexes verläuft. Unter dieser Bedingung ist die Geschwindigkeit der Bildung von P (Angiotensin) proportional der Konzentration des Enzymsubstratkomplexes (ES) und man kann die Reaktionsgeschwindigkeit als Maß für die Konzentration des ES-Komplexes ansehen.

Geht man von einer gegebenen Menge Enzym aus und erhöht nach und nach die Substratkonzentration, so wird immer mehr Enzym in den Enzymsubstratkomplex überführt und die Reaktionsgeschwindigkeit (Bildung von P pro Zeiteinheit) steigt solange, bis alles Enzym als Enzymsubstratkomplex vorliegt. Bei dieser "Enzymsättigung" besitzt die Reaktionsgeschwindigkeit ihre maximale Größe.

Um eine Aussage über die Affinität zwischen Enzym und Substrat zu erhalten, ist es am einfachsten, die Michaeliskonstanten dieser Reaktion zu bestimmen, d.h. die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht oder das Enzym zur Hälfte mit Substrat gesättigt ist. Eine kleine Michaeliskonstante bedeutet also, daß zur Erzielung der Halbsättigung eine niedrige Substratkonzentration notwendig ist; das Enzym hat somit eine große Affinität zum Substrat.

Von mehreren Autoren sind bereits im Zusammenhang mit der Bestimmung von Renin und Reninsubstrat im menschlichen Plasma enzymkinetische Un-

tersuchungen mit Renin und Substrat verschiedener Spezies durchgeführt (20,25,28,38,40,42) sowie Michaeliskonstanten für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und verschiedenen Angiotensinogenen und für die Reaktion zwischen Schweinerenin und tierischen Substraten bestimmt worden (13,14,20,25,38,42,45,46).

Die Tabelle 5 zeigt eine Zusammenstellung aller in der Literatur auffindbaren Michaeliskonstanten für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und verschiedenen Substraten.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, wurden für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und menschlichem Substrat unterschiedliche k_M -Werte bestimmt. Während Haas und Mitarb. (25) eine Michaeliskonstante von 185 ng/ml angeben, weichen die Bestimmungen von Poulsen (42) mit 69,7 ng/ml und von Pickens und Mitarb. (38) (330 ng/ml) deutlich von diesem Wert ab.

Tabelle 5

<i>Autor</i>	<i>Substrat</i>	<i>pH-Wert</i>	<i>Inkubationsmilieu</i>	<i>Substratbereich (ng Å AT/ml)</i>	<i>k_M-Wert (ng Å AT/mL)</i>
<i>Haas (25)</i>	<i>Mensch 1)</i>	<i>6,9</i>	<i>neutrale, gepufferte NaCl-enthaltene Lösung</i>	<i>313, 627, 1254</i>	<i>185</i>
<i>Poulsen (42)</i>	<i>Mensch 4)</i>	<i>7,5</i>	<i>0,2m Tris-puffer</i>	<i>ca. 5 - 400</i>	<i>69,7</i>
<i>Pickens (38)</i>	<i>Mensch 4)</i>	<i>5,5</i>	<i>?</i>	<i>ca. 50 - 500</i>	<i>ca.330</i>
<i>Dahlheim (14)</i>	<i>Rind 2)</i>	<i>6,5</i>	<i>0,15m Phosphatpuffer</i>	<i>ca.120 - 1500</i>	<i>151</i>
<i>Gould (20)</i>	<i>Schwein 5)</i>	<i>7,4</i>	<i>1m Na₂ HPO₄- Na H₂ PO₄- Puffer</i>	<i>ca. 80 - 2100</i>	<i>ca 200</i>

Tabelle 5 Fortsetzung

Autor	Substrat	pH-Wert	Inkubations- milieu	Substratbereich (ng AAT/ml)	k_M -Wert (ng AAT/ml)
Dahlheim (14)	Schwein 2)	7,5	0,15 m Phos- phatpuffer	ca. 40 - 1100	327
Dahlheim (14)	Hund 2)	6,1	0,15 m Phos- phatpuffer	ca. 60 - 770	655
Dahlheim (14)	Ratte 2)	6,0	0,15 m Phos- phatpuffer	ca. 50 - 290	1330
Skinner (46)	Schaf 3)	7,5	EdTA-Na ₂ und NaCl-haltiger Natriumphos- phatpuffer	ca. 55 - 1070	160
Poulsen (42)	Katze 4)	7,5	0,2 m Tris- puffer	ca. 5 - 500	69,4

Anmerkung:

- 1) Substratpräparation : Hoas : *Circulat Res.* 19, 739, 1966
- 2) " : Dahlheim : *Pflügers Arch.* 298, 131, 1967
- 3) " : Skinner : *Circulat Res.* XX, 391, 1967
- 4) reninfreies- und angiotensinasefreies, ungereinigtes Plasma
- 5) Substratpräparation : Skeggs : *J. Exp. Med.* 118, 73, 1963

Für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und Schweinesubstrat differieren die k_M -Werte zwischen 200 und 330 ng/ml (Gould, Dahlheim). Weiterhin wurden von Dahlheim und Mitarb. (14) folgende Michaeliskonstanten ermittelt: für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und Hundesubstrat 655 ng/ml, zwischen menschlichem Renin und Rindersubstrat 151 ng/ml und zwischen menschlichem Renin und Rattensubstrat 1330 ng/ml. Von Poulsen (42) wurde für die Reaktion von menschlichem Renin mit Katzensubstrat eine Michaeliskonstante von 69,4 ng/ml gefunden. Ungefähr übereinstimmende k_M -Werte zwischen 1500 und 1900 ng/ml fanden Dahlheim (13)

und Skeggs (45) für die Reaktion zwischen Schweinerenin und seinem homologen Substrat.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse der Michaeliskonstanten sind z.T. darauf zurückzuführen, daß die Sättigungskonzentration von Enzym zu Enzym und für ein Enzym von Substrat zu Substrat verschieden ist und somit die Reaktionskinetik der Renine und Substrate verschiedener Spezies unterschiedlich verläuft. Es ist daher anzunehmen, daß die einzelnen Renine und Substrate der verschiedenen Spezies unterschiedliche Strukturen besitzen. Weiterhin kommt noch hinzu, daß die kinetischen Messungen der einzelnen Autoren unter verschiedenen Versuchsbedingungen durchgeführt wurden, d.h. mit unterschiedlich präpariertem Substrat, Anwendung nicht identischer pH-Werte und Pufferlösungen. (siehe Tab. 5)

Im Teil III (2.a), b) der vorliegenden Arbeit wurden zunächst für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und Rindersubstrat eine Michaeliskonstante von 300 ng/ml und für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und Hammelsubstrat ein K_M -Wert von 230 ng/ml bestimmt. Da jedoch bei der Bestimmung dieser Werte der prozentuale Substratumsatz in einigen Fällen 20 % überschritten hatte, die Bedingung einer konstanten Substratkonzentration also nicht mehr voll erfüllt war, sind sie nur bedingt als repräsentativ anzusehen. Berechnet man, soweit es möglich ist, die Substratumsätze der Reaktionen, die von den in der Tabelle angeführten Autoren bei ihren Untersuchungen erhalten wurden, so kann man folgendes feststellen: Auch bei Haas (25), Poulsen (42) und Pickens (38) liegen die Substratumsätze bei kleinen Substratkonzentrationen deutlich zu hoch (teilweise bis 50 %), so daß auch bei diesen Untersuchungen keine konstante Substratkonzentration gewahrt wurde und die so ermittelten Michaeliskonstanten nicht den wahren Werten entsprechen. Bei den Untersuchungen von Skinner (46) läßt sich, da keine Inkubationszeiten angegeben sind, nicht feststellen, ob die Substratumsätze zu hoch sind. Ebenso ist es nicht möglich, die Reaktionsumsätze von Dahlheim (14) zu bestimmen, da die gemessenen Angiotensinmengen auf Goldblatteinheiten umgerechnet und außerdem in den einzelnen Inkubationsansätzen die hinzugegebene Renin-

menge variiert wurden.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß den in der Tabelle angegebenen Autoren z.T. der gleiche Fehler unterlaufen ist, Michaeliskonstanten unter nicht exakten Versuchsbedingungen zu bestimmen, d.h. bei nicht konstanter Substratkonzentration.

Wie bereits vorn angedeutet, ist es sehr schwierig, einerseits den Substratumsatz bei kleinen Substratkonzentrationen unter 15 % zu halten und andererseits die dann entstandenen Angiotensinmengen im Blutdruckversuch an der Ratte zu messen. Die erhaltenen Angiotensinmengen sind in diesen Fällen so gering, daß sie unterhalb der Empfindlichkeitsgrenze der Ratte liegen und die Ratte somit keine Blutdrucksteigerung mehr erfährt.

Mit Hilfe der bereits beschriebenen Methode von Boucher (1) einschließlich der Gefriertrocknung ist es gelungen, den Substratumsatz unter 15 % zu halten und gleichzeitig die entstandene Angiotensinmenge zu konzentrieren, so daß eine Blutdruckmessung der Ratte im Bioassay durchführbar war. Somit war es möglich, unter Einhaltung der Bedingungen von Michaelis und Menten erneut k_M -Bestimmungen durchzuführen.

Im Teil III (2.c), d)) der Arbeit wurden mit dieser Methode für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und Rindersubstrat eine Michaeliskonstante von 69 ng/ml und für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und Hammelsubstrat ein k_M -Wert von 160 ng/ml gemessen.

In der folgenden Tabelle sind die Werte der Michaeliskonstanten beider Bestimmungen gegenüber gestellt.

siehe umseitig

Tabelle 6

Substrat	pH-Wert	Inkubationsmilieu	Substratbereich (ng A AT/ml)	k_M -Wert (ng A AT/ml)
Rind 1)	7,4	0,005m Trispuffer	43 - 1080	300
Hammel 2)	7,4	0,005m Trispuffer	21 - 331	233
Rind 3)	7,4	0,005m Trispuffer	20 - 243	69
Hammel 4)	7,4	0,005m Trispuffer	17 - 756	160

Anmerkung: 1) und 2) = alte Methode; 3) und 4) = Methode nach Boucher

Vergleicht man die mit beiden Methoden ermittelten Michaeliskonstanten miteinander, so erkennt man, daß die unter exakten Bedingungen gemessenen k_M -Werte (Boucher-Methode) deutlich kleiner sind. Das hat folgende Ursache: Da bei den ersten Messungen der Substratumsatz etwas zu hoch war, nimmt die Substratkonzentration während der Reaktion ab und die Reaktionsgeschwindigkeit wird folglich kleiner, d.h. die Anfangsgeschwindigkeit bei kleinen Substratkonzentrationen ist niedriger als es bei einer konstanten Substratkonzentration der Fall wäre. Somit verläuft die Kurve (Abszisse: Substratkonzentration, Ordinate: Reaktionsgeschwindigkeit) bei kleinen Substratkonzentrationen flacher und die halbmaximale Geschwindigkeit der Reaktion wird erst bei höherer Substratkonzentration erreicht, die Michaeliskonstante wird größer.

Die unter Zuhilfenahme der Methode von Boucher bestimmte Michaeliskonstante von 160 ng/ml für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und Hammelsubstrat stimmt mit der von Skinner (46) ermittelten überein. Der von uns gemessene k_M -Wert (69 ng/ml) für die Angiotensinbildung aus Rinderangiotensinogen durch menschliches Renin unterscheidet sich deutlich von dem, der den Ergebnissen von Dahlheim (14) zu entnehmen ist. Diese Untersuchungsergebnisse lassen sich jedoch nur bedingt miteinander vergleichen, da die Bestimmungen unter verschiedenen Versuchsbe-

dingungen (Präparation des Substrates, Pufferlösung, pH-Wert) durchgeführt wurden und es außerdem nicht ersichtlich ist, ob die Untersuchungen von Dahlheim bei konstanter Substratkonzentration erfolgten.

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch Untersuchungen von Skinner (48) an Frauen, die mit hormonalen Antikonzeptiva behandelt waren. Er fand noch bei Substratkonzentrationen von über 1000 ng/ml bei unveränderter Reninkonzentration eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit. Auch Helmer (29) beschreibt den Effekt von Östrogenen auf die Renin-Substrat-Reaktion bei schwangeren Frauen. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen von Haas (25), Poulsen (42) und Pickens (38), die für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und seinem Substrat Michaeliskonstanten zwischen 70 und 300 ng/ml gemessen haben, so kann die durch Östrogen bedingte Steigerung der Angiotensinbildung z.T. dadurch erklärt werden, daß durch Östrogen induziertes Substrat von dem üblichen Substrat verschieden ist. In einer neueren Arbeit von Skinner (49) wird jedoch gezeigt, daß es auch bei nicht mit Östrogenen behandelten Frauen zu einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit der Renin-Substrat-Reaktion bei Substratkonzentrationen von weit über 1000 ng/ml kommen kann, es somit durchaus denkbar ist, daß im zirkulierenden Plasma Substanzen vorhanden sind, die die Renin-Substrat-Reaktion beeinflussen. In *in vitro* Systemen können nach der Präparation offenbar ganz andere kinetische Verhältnisse vorliegen.

Über die Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Elektrolytkonzentration des Inkubationsmediums sind bisher nur wenige Arbeiten in der Literatur erschienen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, konnte Bumpus (8) in seinen Versuchen zeigen, daß die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit in physiologischer Kochsalzlösung höher als in elektrolytfreier Lösung ist. Er erklärt diese Ergebnisse damit, daß durch das Ionenmilieu die "intermolekulare Wechselwirkung" des Renins und des Reninsubstrates mit anderen Plasmaproteinen vermindert wird und es zu einer erhöhten Angiotensinbildungsgeschwindigkeit kommt. Boucher (1) konnte bei seinen Messungen mit Rattenplasma und Rattenrenin keine signifikanten Änderungen der

Angiotensinbildung bei Zusatz von NaCl zum Inkubationsgemisch feststellen. Kinetische Messungen von Montague (35) mit synthetischem Substrat (Tetradecapeptid) und Schweinerenin zeigten keinen Einfluß der Ionen auf diese Kinetik. Dagegen ergaben Untersuchungen von Dahlheim und Mitarb. (11) eine deutliche Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Ionenstärke des Inkubationsmediums. Danach nimmt die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit mit zunehmender Natriumkonzentration deutlich ab. In Ergänzung zu diesen Ergebnissen konnten die gleichen Autoren in einer neueren Arbeit (13) bei Verwendung von angereicherter Schweineangiotensinogen und homologem Renin eine ihrer Meinung nach charakteristische Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Ionenstärke bei Anwesenheit von NaCl, NaBr, KCl oder Na_2SO_4 im Inkubationsgemisch mit einem Maximum der Angiotensinbildung zwischen 15 und 20 mM/l (entsprechend einer Ionenstärke unserer Definition (siehe S. 21) von 0,015 - 0,02) und einem hyperbelähnlichen Abfall oberhalb dieser Ionenstärke zeigen. Von den Autoren wurde dieser Verlauf folgendermaßen erklärt: Im Bereich des steilen Anstieges der Angiotensinbildung wird einmal die Assoziatbildung des im Inkubationsgemisch vorhandenen Wassers durch die steigende Natriumkonzentration gestört, womit mehr Wasser für die enzymatische Spaltungsreaktion zur Verfügung steht und ferner werden Proteine, die in reinem Wasser assoziiert vorliegen, entassoziiert. Die Abnahme der Angiotensinbildung im Bereich höherer Ionenstärken sei durch die starke Hydratbildung der Elektrolyte und des daraus resultierenden Verlustes der für die enzymatische Reaktion benötigten Wassermoleküle bedingt.

Vergleicht man damit unsere eigenen Ergebnisse, so läßt sich bei den Untersuchungen mit menschlichem Renin und Hammelssubstrat bei Verwendung einer Substratkonzentration von 414 ng/ml eine tendenziell ähnliche Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Ionenstärke in Anwesenheit von NaBr und Na_2SO_4 mit einem Maximum bei 0,024 bzw. 0,018 und ein Abfall oberhalb dieser Ionenstärke erkennen. Bei Verwen-

dung einer Hammelsubstratkonzentration von 138 ng/ml ist dagegen lediglich in Anwesenheit von NaCl zwischen Ionenstärken von 0,012 und 0,03 ein Maximum vorhanden. Übereinstimmend mit den Untersuchungen von Dahlheim fällt die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit mit weiter steigenden Ionenstärken für die verwendeten Ionen wieder leicht ab.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit menschlichem Renin und Rindersubstrat, die unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, zeigten im Gegensatz zum Hammelsubstrat keine eindeutige Abhängigkeit der Angiotensinbildung von der Ionenstärke des Inkubationsmediums. Lediglich bei Verwendung einer Substratkonzentration von 117 bzw. 350 ng/ml ist ein angedeutetes Maximum in Anwesenheit von Na_2SO_4 zwischen Ionenstärken von 0,012 bis 0,03 und in Anwesenheit von NaCl ein Maximum zwischen Ionenstärken von 0,012 bis 0,03 (Substratkonzentration 117 ng/ml) zu erkennen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich mit denen von Dahlheim und Mitarb. können vielleicht dadurch erklärt werden, daß diese Autoren ihre Untersuchungen beim jeweiligen pH-Optimum der Renin-Substrat-Reaktion (eigene Bestimmung) durchführten, während wir, um die Messungen möglichst unter physiologischen Bedingungen ablaufen zu lassen, einen pH-Wert von 7,4 benutzten. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre durch die Verwendung anderer und anders gereinigter Substrate und Renine gegeben.

Interessant ist außerdem die Frage, ob die Natriumkonzentration des Inkubationsmediums die Affinität zwischen Enzym und Substrat verändert, die sich ja, wie bereits gesagt, in einer unterschiedlichen Größe der Michaeliskonstanten ausdrückt. Auf den nachfolgenden Tabellen (7-9) sind sämtliche Werte der Michaeliskonstanten bei verschiedenen Salzkonzentrationen zusammengestellt.

siehe umseitig

Tabelle 7

Substrat	Renin	NaCl (mMol/l)	k_M -Wert (ng A' AT/ml)
Rind	Mensch	0	300
Rind	Mensch	20	300
Rind	Mensch	60	380
Rind	Mensch	140	210

Tabelle 8

Substrat	Renin	NaCl (mMol/l)	k_M -Wert (ng A' AT/ml)
Hammel	Mensch	0	233
Hammel	Mensch	20	180
Hammel	Mensch	60	146
Hammel	Mensch	140	150

Tabelle 9

Substrat	Renin	NaCl (m Mol/l)	k_M -Wert (ng A' AT/ml)
Rind	Mensch	0	69
Rind	Mensch	140	56
Hammel	Mensch	0	160
Hammel	Mensch	140	137

Die im Teil III (2.a), b)) dargestellten Ergebnisse (Tabelle 7 und 8) zeigen, daß mit zunehmender Natriumkonzentration des Inkubationsmediums die Michaeliskonstante kleiner wird, obwohl die Bedingung einer konstanten Substratkonzentration nicht immer gewährleistet war. Eine Abweichung von dieser Tendenz besteht lediglich für menschliches Renin und Rindersubstrat bei einer Natriumkonzentration von 60 mMol/l.

Dieses Untersuchungsergebnis wurde mit der Methode von Boucher (1), die die Messung der Michaeliskonstanten bei geringer Substratumsetzung gestattet, bestätigt. (Tabelle 9)

Mit beiden Methoden ergibt sich also für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und Rinder- bzw. Hammelsubstrat bei der höchsten Salzkonzentration ein k_M -Wert, der deutlich kleiner ist als der im elektrolytfreien Milieu gemessene. Zwar wurde wegen der Aufwendigkeit der Methode und des Mangels an weiterem Substrat die Versuchsreihe jeweils nur einmal durchgeführt, so daß ein statistischer Beweis nicht erbracht werden kann. Da jedoch bei sämtlichen Untersuchungen die gleiche Tendenz, nämlich eine Abnahme der Michaeliskonstanten mit steigender Salzkonzentration zu erkennen ist, erscheint ein reeller Einfluß der Ionenstärke des Inkubationsmediums auf die Renin-Substrat-Reaktion wahrscheinlich. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit denen anderer Autoren ist nicht möglich, da Untersuchungen dieser Art bisher nicht existieren.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Im Anfangsteil der Arbeit werden in einer Übersicht die biochemischen Eigenschaften des Renin-Angiotensin-Systems zusammengefaßt und die Mechanismen der Reninsekretion diskutiert.

Nach den heutigen Kenntnissen wird das Renin mit größter Wahrscheinlichkeit in den Granula der epitheloiden Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere gebildet. Worin der adäquate Reiz für die Reninsekretion in die Blutbahn besteht, kann noch nicht endgültig beantwortet werden: Die meisten experimentellen Untersuchungen sprechen jedoch dafür, daß die sog. Macula densa, ein mit hohen Epithelzellen ausgestattetes Areal im fröhdistalen Tubulus, unmittelbar neben den juxtaglomerulären Zellen des vas afferens, eine Rezeptorfunktion für Elektrolytkonzentrationen besitzt und damit in der Lage ist, Änderungen der ionalen Zusammensetzung der Tubulusflüssigkeit (Natriumkonzentration) zu registrieren. Diese Information könnte an die juxtaglomerulären Zellen übermittelt werden, die darauf mit einer Zu- oder Abnahme der Reninsekretion reagieren. Es ist auch möglich, daß in den juxtaglomerulären Zellen selbst in Abhängigkeit von der intrazellulären Natriumkonzentration Angiotensin gebildet werden kann. Einige in vitro Untersuchungen ließen vermuten, daß das Ionenmilieu einen direkten Einfluß auf die Kinetik der Renin-Substrat-Reaktion ausübt, so daß die folgende Frage interessant war:

Haben Änderungen der Ionenkonzentration einen direkten Einfluß auf die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit und auf die Affinität zwischen Renin und Substrat in vitro?

Zur Lösung dieser Frage wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- 1) Bestimmungen der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit aus der Renin-Substrat-Reaktion in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration für menschliches Renin und Rinder- bzw. Hammelsubstrat.
- 2) Bestimmungen der Michaeliskonstanten dieser Reaktionen in An- und Abwesenheit von Natriumsalzen.

Das Prinzip aller durchgeführten Untersuchungen war die Inkubation von teilgereinigtem, angiotensinasefreiem Renin und Reninsubstrat und die biologische Testung des gebildeten Angiotensins an der Ratte.

Ergebnisse:

- 1) Bei der Reaktion zwischen menschlichem Renin und Hammelsubstrat (Ausgangskonzentration 414 ng/ml) ist eine Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Ionenstärke in Anwesenheit von NaBr und Na_2SO_4 mit einem Maximum bei 0,024 bzw. 0,018 und ein Abfall oberhalb dieser Ionenstärke zu beobachten.
Bei Verwendung einer Hammelsubstratlösung von 138 ng/ml besteht lediglich bei Zusatz von NaCl ein Maximum der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit zwischen Ionenstärken von 0,012 bis 0,03. Oberhalb einer Ionenstärke von 0,03 fällt die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit in Anwesenheit aller verwendeter Salze ab.
- 2) Die Untersuchungen, die mit Rinderangiotensinogen in drei verschiedenen Konzentrationen unter den gleichen Bedingungen vorgenommen wurden, zeigten keine so deutliche Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Ionenstärke des Inkubationsmediums. Es war lediglich ein angedeutetes Maximum bei Anwesenheit von Natriumsulfationen zwischen Ionenstärken von 0,012 bis 0,03 bei Verwendung der Substratkonzentration 117 bzw. 350 ng/ml und ein Maximum in Anwesenheit von Natriumchlorid zwischen Ionenstärken von 0,012 bis 0,03 (Substratkonzentration 117 ng/ml) zu erkennen.
- 3) Mit zwei verschiedenen Methoden wurden Michaeliskonstanten für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und Rinder- bzw. Hammelsubstrat in elektrolytfreiem Milieu und in Anwesenheit unterschiedlicher Natriumchloridkonzentrationen im Inkubationsmedium bestimmt. Die Ergebnisse sind auf S. 58 zusammengefaßt.
Die mit unterschiedlichen Methoden gemessenen Michaeliskonstanten werden miteinander verglichen. Dabei wird die Problematik exakter kinetischer Messungen diskutiert.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Michaeliskonstanten generell mit zunehmender Natriumkonzentration im Inkubationsmilieu kleiner werden. Mit der zusätzlich angewandten Methode von Boucher (1), die es erlaubt, auch bei sehr kleinen Substratkonzentrationen im Inkubationsansatz genaue Angiotensinbestimmungen bei der Ratte durchzuführen, ist die Tendenz einer Abnahme der Michaeliskonstanten mit steigender Salzkonzentration bestätigt worden, so daß die vorliegenden Ergebnisse einen reellen Einfluß der Ionenstärke auf die Renin-Substrat-Reaktion wahrscheinlich machen.

Die Untersuchungsergebnisse werden diskutiert und mit denen anderer Autoren verglichen.

Verwendete Abkürzungen in den Tabellen :

m.Re.	➤ menschliches Renin
Ra.Re.	➤ Rattenrenin
Ra.Sub.	➤ Rattensubstrat
Ri.Sub.	➤ Rindersubstrat
Ha.Sub.	➤ Hammelsubstrat
Tris.	➤ Trispufferlösung 0,005 m, pH 7,4
Elek.	➤ Elektrolytlösung
By-Tr.	= Bycomycin-Trispufferlösung
I	= Ionenstärke
1+4, 1+9	= 1 ml Renin mit 4 bzw. 9 ml Trispuffer verdünnt
(S)	= Substratkonzentration
(v)	= Angiotensinbildungsgeschwindigkeit
1/S	= reziproker Wert der Substratkonzentration
1/v	= reziproker Wert der Reaktionsgeschwindigkeit der Angiotensinbildung
Konz(S) ng/ml A	➤ Substratkonzentration (ng Äquivalent Angiotensin II/ml Ansatz)
nat.AT	➤ natürliches Angiotensin (Asp ¹ -Val ⁵ -Angiotensin II)
Ink.	➤ Inkubation
Erg.(MW)	➤ Ergebnis (Mittelwert)

Tabelle 1: Bestimmung des Rattensubstratgehaltes (II B)

m.Re. ml	Ra.Sub. ml	By-Tr. ml	Tris. ml	Ink. h	Erg. ng AT/ml
0,5	0,2	0,1	0,2	2	32,0
0,5	0,2	0,1	0,2	4	54,0
0,5	0,2	0,1	0,2	6	115,0
0,5	0,2	0,1	0,2	8	116,5

Ratten-Substratgehalt: 575 ng/ml

Tabelle 2: Bestimmung der Angiotensinaseaktivität von Rattensubstrat (II B)

Tris. ml	Ra.Sub. ml	nat.AT ml	By-Tr. ml	Ink. h	Erg. ng AT/ml
0,7	-	0,2	0,1	12	155,5
0,7	-	0,2	0,1	12	155,5
0,2	0,5	0,2	0,1	12	85,0
0,2	0,5	0,2	0,1	12	98,5

Tabelle 3: Bestimmung der Angiotensinaseaktivität von Rattenrenin und Rattensubstrat (II B)

Elek. ml	Tris. ml	nat.AT ml	By-Tr. ml	Ra.Sub. ml	Ra.Re. ml	Ink. h	Erg. ng AT/ml
0,6	0,2	0,1	0,1	-	-	12	104,0
0,6	0,2	0,1	0,1	-	-	12	110,5
0,3	0,2	0,1	0,1	0,3	-	12	123,0
0,3	0,2	0,1	0,1	0,3	-	12	145,5
0,4	0,2	-	0,1	0,3	-	12	15,5
0,4	0,2	-	0,1	0,3	-	12	10,1
0,4	0,2	0,1	0,1	-	0,2	12	7,5
0,4	0,2	0,1	0,1	-	0,2	12	22,5
0,5	0,2	-	0,1	-	0,2	12	0
0,5	0,2	-	0,1	-	0,2	12	8,5

Tabelle 4: Bestimmung der Angiotensinaseaktivität von Rattenrenin (II B)

Tris. ml	Ra.Re. ml	nat.AT ml	By-Tr. ml	Ink. h	Erg. ngAT/ml
0,7	-	0,2	0,1	12	155,5
0,7	-	0,2	0,1	12	155,5
0,5	0,2	0,2	0,1	12	0
0,5	0,2	0,2	0,1	12	16,5

Tabelle 5: Bestimmung des Rindersubstratgehaltes (II C_{2a})

Ri.Sub. ml	m.Re. ml	By-Tr. ml	Tris. ml	Ink. h	Erg. ng AT/ml
0,1	0,5	0,1	0,3	2	35,0
0,1	0,5	0,1	0,3	2	33,0
0,1	0,5	0,1	0,3	4	35,5
0,1	0,5	0,1	0,3	4	34,5

Rinder-Substratgehalt: 350 ng/ml

Tabelle 6: Bestimmung des Hammelsubstratgehaltes (II C_{3a})

Ha.-Sub. ml	m.Re. ml	By-Tr. ml	Tris. ml	nat.AT ml	Ink. h	Erg. ng AT/ml
0,05	0,5	0,1	0,35	-	3	21,6
0,10	0,5	0,1	0,30	-	3	38,7
0,05	0,5	0,1	0,35	-	6	20,9
0,10	0,5	0,1	0,30	-	6	41,7
0,50	-	0,1	0,30	0,1	6	98,8
-	-	0,1	0,80	0,1	6	90,9

Hammel-Substratgehalt: 418 ng/ml

Tabelle 7: Bestimmung des Rindersubstratgehaltes nach Konzentrierung
(II C_{3a})

Ri.Sub. ml	m.Re. ml	By-Tr. ml	Tris. ml	Ink. h	Erg. ngAT/ml
0,05	0,5	0,1	0,35	2	56,5
0,05	0,5	0,1	0,35	2	60,0
0,05	0,5	0,1	0,35	4	80,0
0,05	0,5	0,1	0,35	4	71,0
0,10	0,5	0,1	0,30	4	117,0
0,10	0,5	0,1	0,30	4	108,5
0,10	0,5	0,1	0,30	8	114,5
0,10	0,5	0,1	0,30	8	118,5

Rinder-Substratgehalt (konz.) = 1350 ng/ml

Tabelle 8: Bestimmung des Hammelsubstratgehaltes nach Konzentrierung
(II C_{3a})

Ha.Sub. ml	m.Re. ml	By-Tr. ml	Tris. ml	Ink. h	Erg. ngAT/ml
0,05	0,5	0,1	0,35	3	94,0
0,05	0,5	0,1	0,35	3	91,5
0,10	0,5	0,1	0,30	4	169,5
0,10	0,5	0,1	0,30	4	150,0
0,05	0,5	0,1	0,35	6	95,0
0,05	0,5	0,1	0,35	6	87,0
0,10	0,5	0,1	0,30	8	180,0
0,10	0,5	0,1	0,30	8	204,0

Hammel-Substratgehalt (konz.) = 1865 ng/ml

Tabelle 9: Bestimmung der Angiotensinase- und Reninaktivität von Hammelssubstrat (II C_{3a+b})

Ha.Sub. ml	By-Tr. ml	Tris. ml	nat.AT ml	Ink. h	Erg.(MW) ng AT/ml
0,5	0,1	0,3	0,1	8	105,0
0,5	0,1	0,3	0,1	8	110,0
-	0,1	0,8	0,1	8	122,5
-	0,1	0,8	0,1	8	105,0
0,5	0,1	0,4	-	8	5,0
0,5	0,1	0,4	-	8	0

Tabelle 10: Bestimmung der Angiotensinase- und Reninaktivität von Rinderssubstrat (II C_{3a+b})

Tris. ml	Ri.Sub. ml	nat.AT ml	By-Tr. ml	Ink. h	Erg. ng AT/ml
0,7	-	0,2	0,1	0	135,0
0,7	-	0,2	0,1	0	155,0
0,7	-	0,2	0,1	12	155,5
0,7	-	0,2	0,1	12	155,5
0,2	0,5	0,2	0,1	12	144,5
0,2	0,5	0,2	0,1	12	166,5
0,4	0,5	-	0,1	12	0
0,4	0,5	-	0,1	12	7,5

Tabelle 11: Bestimmung der Angiotensinaseaktivität von menschlichem Renin (II C_{3b})

Tris. ml	m.Re. ml	nat.AT ml	By-Tr. ml	Ink. h	Erg. ngAT/ml
0,7	-	0,2	0,1	0	135,0
0,7	-	0,2	0,1	0	155,0
0,7	-	0,2	0,1	12	155,5
0,7	-	0,2	0,1	12	155,5
0,5	0,2	0,2	0,1	12	135,5
0,5	0,2	0,2	0,1	12	151,5

Tabelle 12: Abhängigkeit der Angiotensinbildung von der Zeit

Ri.Sub. ml	m.Re. ml	By-Tr. ml	Tris. ml	
4,0	0,1	0,1	0,8	im Eisbad pipetiert und dann
4,0	0,1	0,1	0,8	1, 2, 3, 4, 8 Stunden im
				Wasserbad bei 37° C inkubiert.

Ergebnis (MW)
(ng AT/ml)

1	2	3	4	8	Stunden
26,8	52,8	71,8	102,8	126,8	

Tabelle 13: Bestimmung der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Inkubationsmediums (Rindersubstratkonzentration ca. 1350 ng/ml) (II C_{4a})

m.Re. ml	Ri.Sub. ml	NaCl ml	1×10^3	Tris. ml	Ink. h	Erg. (MW) ng AT/ml
0,05	0,8	0,1	150	0,05	1	129,0
0,05	0,8	0,1	90	0,05	1	130,8
0,05	0,8	0,1	60	0,05	1	128,0
0,05	0,8	0,1	30	0,05	1	114,0
0,05	0,8	0,1	24	0,05	1	100,5
0,05	0,8	0,1	18	0,05	1	97,5
0,05	0,8	0,1	12	0,05	1	85,0
0,05	0,8	0,1	6	0,05	1	87,8

m.Re. ml	Ri.Sub. ml	NaBr ml	1×10^3	Tris. ml	Ink. h	Erg. (MW) ng AT/ml
0,05	0,8	0,1	150	0,05	1	103,3
0,05	0,8	0,1	90	0,05	1	114,8
0,05	0,8	0,1	60	0,05	1	115,3
0,05	0,8	0,1	30	0,05	1	107,0
0,05	0,8	0,1	24	0,05	1	83,8
0,05	0,8	0,1	18	0,05	1	77,0
0,05	0,8	0,1	12	0,05	1	85,5
0,05	0,8	0,1	6	0,05	1	90,5

m.Re. ml	Ri.Sub. ml	Na ₂ SO ₄ ml	1×10^3	Tris. ml	Ink. h	Erg. (MW) ng AT/ml
0,05	0,8	0,1	150	0,05	1	80,0
0,05	0,8	0,1	90	0,05	1	85,0
0,05	0,8	0,1	60	0,05	1	100,0
0,05	0,8	0,1	30	0,05	1	98,3
0,05	0,8	0,1	24	0,05	1	96,0
0,05	0,8	0,1	18	0,05	1	86,8

Fortsetzung Tabelle 13

m.Re. ml	Ri.Sub. ml	Na ₂ SO ₄ ml	I x 10 ³	Tris. ml	Ink. h	Erg. (MW) ng AT/ml
0,05	0,8	0,1	12	0,05	1	76,3
0,05	0,8	0,1	6	0,05	1	82,5

Tabelle 14: Bestimmung der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Inkubationsmediums (Rindersubstratkonzentration ca. 350 ng/ml) (II C_{4a})

m.Re. ml	Ri.Sub. ml	NaCl ml	I x 10 ³	Tris. ml	Ink. h	Erg. (MW) ng AT/ml
0,05	0,8	0,1	150	0,05	1	48,5
0,05	0,8	0,1	90	0,05	1	80,8
0,05	0,8	0,1	60	0,05	1	95,8
0,05	0,8	0,1	30	0,05	1	90,0
0,05	0,8	0,1	24	0,05	1	87,0
0,05	0,8	0,1	18	0,05	1	85,0
0,05	0,8	0,1	12	0,05	1	75,0
0,05	0,8	0,1	6	0,05	1	83,8

m.Re. ml	Ri.Sub. ml	NaBr ml	I x 10 ³	Tris. ml	Ink. h	Erg. (MW) ng AT/ml
0,05	0,8	0,1	150	0,05	1	66,0
0,05	0,8	0,1	90	0,05	1	87,2
0,05	0,8	0,1	60	0,05	1	85,2
0,05	0,8	0,1	30	0,05	1	88,0
0,05	0,8	0,1	24	0,05	1	105,8
0,05	0,8	0,1	18	0,05	1	100,7
0,05	0,8	0,1	12	0,05	1	106,0
0,05	0,8	0,1	6	0,05	1	104,7

Fortsetzung Tabelle 14

m.Re. ml	Ri.Sub. ml	Na ₂ SO ₄ ml	1×10^3	Tris. ml	Ink. h	Erg.(MW) ng AT/ml
0,05	0,8	0,1	150	0,05	1	80,0
0,05	0,8	0,1	90	0,05	1	86,0
0,05	0,8	0,1	60	0,05	1	88,0
0,05	0,8	0,1	30	0,05	1	93,5
0,05	0,8	0,1	24	0,05	1	100,0
0,05	0,8	0,1	18	0,05	1	103,0
0,05	0,8	0,1	12	0,05	1	91,8
0,05	0,8	0,1	6	0,05	1	57,3

Tabelle 15: Bestimmung der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Inkubationsmediums (Rindersubstratkonzentration ca. 117 ng/ml) (II C_{4a})

m.Re. ml	Ri.Sub. ml	NaCl ml	1×10^3	Tris. ml	Ink. h	Erg.(MW) ng AT/ml
0,05	0,8	0,1	150	0,05	1	35,8
0,05	0,8	0,1	90	0,05	1	38,3
0,05	0,8	0,1	60	0,05	1	41,8
0,05	0,8	0,1	30	0,05	1	48,5
0,05	0,8	0,1	24	0,05	1	43,5
0,05	0,8	0,1	18	0,05	1	46,0
0,05	0,8	0,1	12	0,05	1	47,0
0,05	0,8	0,1	6	0,05	1	33,3

m.Re. ml	Ri.Sub. ml	NaBr ml	1×10^3	Tris. ml	Ink. h	Erg.(MW) ng AT/ml
0,05	0,8	0,1	150	0,05	1	35,8
0,05	0,8	0,1	90	0,05	1	33,8

Fortsetzung Tabelle 15

m.Re. ml	Ri.Sub. ml	NaBr ml	$I \times 10^3$	Tris. ml	Ink. h	Erg. (MW) ng AT/ml
0,05	0,8	0,1	60	0,05	1	35,0
0,05	0,8	0,1	30	0,05	1	33,0
0,05	0,8	0,1	24	0,05	1	38,3
0,05	0,8	0,1	18	0,05	1	33,0
0,05	0,8	0,1	12	0,05	1	36,0
0,05	0,8	0,1	6	0,05	1	34,8
m.Re. ml	Ri.Sub. ml	Na ₂ SO ₄ ml	$I \times 10^3$	Tris. ml	Ink. h	Erg. (MW) ng AT/ml
0,05	0,8	0,1	150	0,05	1	27,0
0,05	0,8	0,1	90	0,05	1	29,5
0,05	0,8	0,1	60	0,05	1	25,0
0,05	0,8	0,1	30	0,05	1	29,3
0,05	0,8	0,1	24	0,05	1	34,0
0,05	0,8	0,1	18	0,05	1	38,3
0,05	0,8	0,1	12	0,05	1	38,3
0,05	0,8	0,1	6	0,05	1	28,0

Tabelle 16: Bestimmung der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Inkubationsmediums (Hammelsubstratkonzentration ca. 414 ng/ml) (II C_{4b})

m.Re. (I+4) ml	Ha.Sub. ml	NaCl ml	$I \times 10^3$	Ink. h	Erg. (MW) ngAT/ml
0,1	0,8	0,1	150	1	47,0
0,1	0,8	0,1	90	1	59,0
0,1	0,8	0,1	60	1	68,0
0,1	0,8	0,1	30	1	62,5

Fortsetzung Tabelle 16

m.Re. (I+4) ml	Ha.Sub. ml	NaCl ml	$I \times 10^3$	Ink. h	Erg. (MW) ng AT/ml
0,1	0,8	0,1	24	1	70,5
0,1	0,8	0,1	18	1	75,0
0,1	0,8	0,1	12	1	68,8
0,1	0,8	0,1	6	1	68,8

m.Re. (I+4) ml	Ha.Sub. ml	NaBr ml	$I \times 10^3$	Ink. h	Erg. (MW) ng AT/ml
0,1	0,8	0,1	150	1	43,0
0,1	0,8	0,1	90	1	55,3
0,1	0,8	0,1	60	1	67,0
0,1	0,8	0,1	30	1	68,5
0,1	0,8	0,1	24	1	81,3
0,1	0,8	0,1	18	1	74,0
0,1	0,8	0,1	12	1	59,5
0,1	0,8	0,1	6	1	64,3

m.Re. (I+4) ml	Ha.Sub. ml	Na ₂ SO ₄ ml	$I \times 10^3$	Ink. h	Erg. (MW) ng AT/ml
0,1	0,8	0,1	150	1	43,0
0,1	0,8	0,1	90	1	49,5
0,1	0,8	0,1	60	1	54,5
0,1	0,8	0,1	30	1	61,5
0,1	0,8	0,1	24	1	59,0
0,1	0,8	0,1	18	1	70,3
0,1	0,8	0,1	12	1	63,0
0,1	0,8	0,1	6	1	51,8

Tabelle 17: Bestimmung der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Inkubationsmediums (Hammelsubstratkonzentration ca. 138 ng/ml) (II C_{4b})

m.Re. (I+4) ml	Ha.Sub. ml	NaCl ml	$I \times 10^3$	Ink. h	Erg. (MW) ng AT/ml
0,1	0,8	0,1	150	1	42,0
0,1	0,8	0,1	90	1	40,8
0,1	0,8	0,1	60	1	42,8
0,1	0,8	0,1	30	1	47,0
0,1	0,8	0,1	24	1	49,0
0,1	0,8	0,1	18	1	56,8
0,1	0,8	0,1	12	1	59,5
0,1	0,8	0,1	6	1	50,3

m.Re. (I+4) ml	Ha.Sub. ml	NaBr ml	$I \times 10^3$	Ink. h	Erg. (MW) ng AT/ml
0,1	0,8	0,1	150	1	29,3
0,1	0,8	0,1	90	1	39,5
0,1	0,8	0,1	60	1	45,0
0,1	0,8	0,1	30	1	49,0
0,1	0,8	0,1	24	1	43,0
0,1	0,8	0,1	18	1	46,3
0,1	0,8	0,1	12	1	47,8
0,1	0,8	0,1	6	1	47,8

m.Re. (I+4) ml	Ha.Sub. ml	Na ₂ SO ₄ ml	$I \times 10^3$	Ink. h	Erg. (MW) ng AT/ml
0,1	0,8	0,1	150	1	35,0
0,1	0,8	0,1	90	1	40,3
0,1	0,8	0,1	60	1	39,8
0,1	0,8	0,1	30	1	40,3
0,1	0,8	0,1	24	1	46,3

Fortsetzung Tabelle 17

m.Re. (1+4) ml	Ha.Sub. ml	Na ₂ SO ₄ ml	1×10^3	Ink. h	Erg. (MW) ngAT/ml
0,1	0,8	0,1	18	1	48,3
0,1	0,8	0,1	12	1	46,8
0,1	0,8	0,1	6	1	49,5

Tabelle 18: Bestimmung der Michaeliskonstanten für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und Rindersubstrat in An- und Abwesenheit von NaCl (II C_{5a})

m.Re. ml	Ri.Sub. ml	Konz. (S) ng/ml A	Tris. ml	Ink. h	Erg. (MW) ngAT/ml	I/S ($\times 10^{-3}$)	I/v (MW) $\times 10^{-3}$
0,1	0,8	1080	0,1	1	155,0	0,92	6,45
0,1	0,8	540	0,1	1	167,5	1,85	5,97
0,1	0,8	360	0,1	1	147,5	2,77	6,77
0,1	0,8	270	0,1	1	160,5	3,70	6,23
0,1	0,8	180	0,1	1	118,5	5,55	8,43
0,1	0,8	90	0,1	1	53,3	11,11	18,77
0,1	0,8	67,5	0,1	1	44,5	14,81	22,47
0,1	0,8	43,2	0,1	1	34,3	23,14	29,19

m.Re. ml	Ri.Sub. ml	Konz. (S) ng/ml A	NaCl 0,2m ml	Ink. h	Erg. (MW) ngAT/ml	I/S $\times 10^{-3}$	I/v (MW) $\times 10^{-3}$
0,1	0,8	1080	0,1	1	189,3	0,92	5,28
0,1	0,8	540	0,1	1	186,8	1,85	5,35
0,1	0,8	360	0,1	1	165,0	2,77	6,06
0,1	0,8	270	0,1	1	165,3	3,70	6,05
0,1	0,8	180	0,1	1	132,0	5,55	7,57
0,1	0,8	90	0,1	1	61,0	11,11	16,39

Fortsetzung Tabelle 18

m.Re. ml	Ri.Sub. ml	Konz. (S) ng/ml A	NaCl 0,2m ml	Ink. h	Erg. (MW) ng AT/ml	I/S $\times 10^{-3}$	I/v (MW) $\times 10^{-3}$
0,1	0,8	67,5	0,1	1	49,3	14,81	20,30
0,1	0,8	43,2	0,1	1	38,5	23,14	25,97

m.Re. ml	Ri.Sub. ml	Konz. (S) ng/ml A	NaCl 0,6m ml	Ink. h	Erg. (MW) ng AT/ml	I/S $\times 10^{-3}$	I/v (MW) $\times 10^{-3}$
0,1	0,8	1080	0,1	1	216,9	0,92	4,61
0,1	0,8	540	0,1	1	192,3	1,85	5,20
0,1	0,8	360	0,1	1	157,2	2,77	6,36
0,1	0,8	270	0,1	1	148,8	3,70	6,72
0,1	0,8	180	0,1	1	126,6	5,55	7,32
0,1	0,8	90	0,1	1	50,3	11,11	19,90
0,1	0,8	67,5	0,1	1	46,0	14,81	21,73
0,1	0,8	43,2	0,1	1	34,5	23,14	28,98

m.Re. ml	Ri.Sub. ml	Konz. (S) ng/ml A	NaCl 1,4m ml	Ink. h	Erg. (MW) ng AT/ml	I/S $\times 10^{-3}$	I/v (MW) $\times 10^{-3}$
0,1	0,8	1080	0,1	1	186,5	0,92	5,36
0,1	0,8	540	0,1	1	150,0	1,85	6,66
0,1	0,8	360	0,1	1	128,8	2,77	7,76
0,1	0,8	270	0,1	1	99,3	3,70	10,07
0,1	0,8	180	0,1	1	95,5	5,55	10,47
0,1	0,8	90	0,1	1	68,0	11,11	14,70
0,1	0,8	67,5	0,1	1	47,3	14,81	21,16
0,1	0,8	43,2	0,1	1	34,5	23,14	28,98

Tabelle 19: Bestimmung der Michaeliskonstanten für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und Hammelsubstrat in An- und Abwesenheit von NaCl (II C_{5b})

m.Re. (I+4) ml	Ha.Sub. ml	Konz. (S) ng/ml A	Tris. ml	Ink. h	Erg. (MW) ngAT/ml	I/S $\times 10^{-3}$	I/v (MW) $\times 10^{-3}$
0,1	0,8	331	0,1	1	60,0	3,02	16,66
0,1	0,8	165,5	0,1	1	53,0	6,04	13,86
0,1	0,8	110,3	0,1	1	46,3	9,06	21,62
0,1	0,8	82,8	0,1	1	36,8	12,07	27,21
0,1	0,8	55,2	0,1	1	30,8	18,11	32,58
0,1	0,8	27,6	0,1	1	13,0	36,23	76,90
0,1	0,8	20,7	0,1	1	11,3	48,30	88,88

m.Re. (I+4) ml	Ha.Sub. ml	Konz. (S) ng/ml A	NaCl 0,2m ml	Ink. h	Erg. (MW) ngAT/ml	I/S $\times 10^{-3}$	I/v (MW) $\times 10^{-3}$
0,1	0,8	331	0,1	1	54,5	3,02	18,3
0,1	0,8	165,5	0,1	1	49,5	6,04	20,2
0,1	0,8	110,3	0,1	1	46,5	9,06	21,5
0,1	0,8	82,8	0,1	1	35,5	12,07	28,1
0,1	0,8	55,2	0,1	1	-	18,11	-
0,1	0,8	27,6	0,1	1	10,5	36,23	95,2
0,1	0,8	20,7	0,1	1	11,5	48,30	86,9

m.Re. (I+4) ml	Ha.Sub. ml	Konz. (S) ng/ml A	NaCl 0,6m ml	Ink. h	Erg. (MW) ngAT/ml	I/S $\times 10^{-3}$	I/v (MW) $\times 10^{-3}$
0,1	0,8	331	0,1	1	56,0	3,02	17,8
0,1	0,8	165,5	0,1	1	46,0	6,04	21,7
0,1	0,8	110,3	0,1	1	40,3	9,06	24,8
0,1	0,8	82,8	0,1	1	28,5	12,07	35,0
0,1	0,8	55,2	0,1	1	20,3	18,11	49,3
0,1	0,8	27,6	0,1	1	11,3	36,23	88,8
0,1	0,8	20,7	0,1	1	11,0	48,30	90,9

Fortsetzung Tabelle 19

m.Re. (I+4) ml	Ha.Sub. ml	Konz. (S) ng/ml A	NaCl 1,4 m ml	Ink. h	Erg. (MW) ngAT/ml	I/S $\times 10^{-3}$	I/v (MW) $\times 10^{-3}$
0,1	0,8	331	0,1	1	55,5	3,02	18,0
0,1	0,8	165,5	0,1	1	-	6,04	-
0,1	0,8	110,3	0,1	1	36,5	9,06	27,3
0,1	0,8	82,2	0,1	1	37,0	12,07	27,0
0,1	0,8	55,2	0,1	1	14,8	18,11	67,7
0,1	0,8	27,6	0,1	1	12,0	36,23	83,3
0,1	0,8	20,7	0,1	1	9,5	48,30	105,2

Tabelle 20: Bestimmung des Rindersubstratgehaltes und der Angiotensinaseaktivität von Rindersubstrat (Boucher-Versuch)
(II C_{3a+b})

Ri.Sub. ml	me.Re. ml	Tris. ml	AT II ml	Ink. h	Erg. (MW) ngAT/ml
0,05	0,8	0,15	-	1	16,5
0,10	0,8	0,10	-	2	28,5
0,05	0,8	0,15	-	3	15,0
0,10	0,8	0,10	-	4	30,0
0,50	-	0,40	0,1	8	98,5
-	-	0,90	0,1	8	100,5

Hammelsubstratgehalt: 1890 ng/ml

Tabelle 21: Bestimmung des Hammelsubstratgehaltes und der Angiotensinaseaktivität von Hammelsubstrat (Boucher-Versuch)
(II C_{3a+b})

Ha.Sub.	m.Re.	Tris.	By-Tr.	AT II	Ink.	Erg. (MW)
ml	ml	ml	ml	ml	h	ngAT/ml
0,05	0,5	0,35	0,1	-	3	89,5
0,10	0,5	0,30	0,1	-	4	188,0
0,05	0,5	0,35	0,1	-	6	94,5
0,10	0,5	0,30	0,1	-	8	190,0
0,50	-	0,30	0,1	0,1	8	105,0
-	-	0,80	0,1	0,1	8	111,5

Hammelsubstratgehalt: 1890 ng/ml

Tabelle 22: Bestimmung der Michaeliskonstanten für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und Rindersubstrat in An- und Abwesenheit von NaCl (Boucher-Methode) (II C_{5c})

m.Re. (I+9)	Ri.Sub.	Konz. (S)	Tris.	Ink.	Erg. (MW)	I/S	I/v
ml	ml	ng/ml A	ml	h	ngAT/ml	x10 ⁻³	(MW) x10 ⁻²
0,5	4,0	243	0,5	1	7,3	4,11	13,70
0,5	4,0	162	0,5	1	6,7	6,17	14,93
0,5	4,0	121	0,5	1	5,5	8,26	18,18
0,5	4,0	97	0,5	1	5,1	10,30	19,61
0,5	4,0	81	0,5	1	-	12,34	-
0,5	4,0	61	0,5	1	3,2	16,39	31,25
0,5	4,0	40	0,5	1	2,4	25,00	41,67
0,5	4,0	30	0,5	1	2,1	33,33	47,62
0,5	4,0	20	0,5	1	1,7	50,00	58,82

Fortsetzung Tabelle 22

m.Re. (I+9) ml	Ri.Sub. ml	Konz. (S) ng/ml A	NaCl 1,4 m ml	Ink. h	Erg. (MW) ngAT/ml	I/S $\times 10^{-3}$	I/v (MW) $\times 10^{-2}$
0,5	4,0	243	0,5	1	4,9	4,11	20,41
0,5	4,0	162	0,5	1	5,2	6,17	19,23
0,5	4,0	121	0,5	1	4,6	8,26	21,74
0,5	4,0	97	0,5	1	4,3	10,30	23,26
0,5	4,0	81	0,5	1	4,1	12,34	24,39
0,5	4,0	61	0,5	1	3,4	16,39	29,14
0,5	4,0	40	0,5	1	2,6	25,00	38,46
0,5	4,0	30	0,5	1	2,1	33,33	47,62
0,5	4,0	20	0,5	1	1,8	50,00	55,55

Tabelle 23: Bestimmung der Michaeliskonstanten für die Reaktion zwischen menschlichem Renin und Hammelsubstrat in An- und Abwesenheit von NaCl (Boucher-Methode) (II C_{5d})

m.Re. (I+9) ml	Ha.Sub. ml	Tris. ml	Konz. (S) ng/ml A	Ink. h	Erg. (MW) ngAT/ml	I/S $\times 10^{-3}$	I/v (MW) $\times 10^{-2}$
0,5	4,0	0,5	756	1	15,2	1,32	6,58
0,5	4,0	0,5	504	1	13,2	1,98	7,58
0,5	4,0	0,5	252	1	10,5	3,96	9,52
0,5	4,0	0,5	126	1	7,6	7,93	13,16
0,5	4,0	0,5	96	1	7,1	10,41	14,08
0,5	4,0	0,5	63	1	5,2	15,87	19,23
0,5	4,0	0,5	31,5	1	2,4	31,74	41,67
0,5	4,0	0,5	15,8	1	1,6	63,29	62,50

Fortsetzung Tabelle 23

m.Re. (I+9) ml	Ha.Sub. ml	NaCl 1,4 m ml	Konz. (S) ng/ml A	Ink. h	Erg. (MW) ngAT/ml	I/S $\times 10^{-3}$	I/v (MW) $\times 10^{-2}$
0,5	4,0	0,5	756	1	17,5	1,32	5,71
0,5	4,0	0,5	504	1	16,0	1,98	6,25
0,5	4,0	0,5	252	1	15,7	3,96	6,37
0,5	4,0	0,5	126	1	12,8	7,93	7,81
0,5	4,0	0,5	96	1	14,8	10,41	6,76
0,5	4,0	0,5	63	1	9,5	15,87	10,53
0,5	4,0	0,5	31,5	1	5,5	31,74	18,18
0,5	4,0	0,5	15,8	1	2,7	63,29	37,04

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. BOUCHER, R., J. Menard, and J. Genest:
A Micromethod for Measurement of Renin in the Plasma
and Kidney of Rats
Can. J. Physiol. Pharmacol. 45, 881, 1967
2. BRAUN-MENENDEZ, E., J.C. Fasciolo, L.F. Leloir, and J.M. Munoz:
The Substance Causing Renal Hypertension
J. Physiol. (Lond.) 98, 283, 1940
3. BRAUN-MENENDEZ, E., and I.H. Page:
Suggested Revision of Nomenclature-Angiotensin
Science 127, 242, 1958
4. BRITTON, K., E.:
Renin and Renal Autoregulation
Lancet II, 329, 1968
5. BROWN, J., J., D.L. Davies, A.F. Lever, J.I.S. Robertson, and
M. Tree:
The Estimation of Renin in Human Plasma
Biochem. J. 93, 594, 1964
6. BROWN, J., J., D.L. Davies, A.F. Lever, and R.A. Parker:
The Assay of Renin in Single Glomeruli in the Normal Rabbit
and the Appearance of the Juxtaglomerular Apparatus
J. Physiol. (Lond.) 176, 418, 1965
7. BROWN, J., J., D.L. Davies, A.F. Lever, and R.A. Parker:
The Assay of Renin in Single Glomeruli and the Appearance
of the Juxtaglomerular Apparatus in the Rabbit Following
Renal Artery Constriction
Clin.Sci. 30, 223, 1966

8. BUMPUS, F., M.:
Factors Affecting Formation and Destruction of Angiotensin
Club international sur l'hypertension arterielle Premiere
Reunion Juli 1963 L'Expansion editeur Paris
9. DE CHAMPLAIN, J., J. Genest, R. Veyrat, and R. Boucher:
Factor Controlling Renin in Man
Arch. intern. Med. 117, 355, 1966
10. CORTNEY, M., A., W. Nagel, and K. Thureau:
A Micropuncture Study of the Relationship Between Flow-
Rate Through the Loop of Henle and Sodium Concentration
in the Early Distal Tubule
Pflügers. Arch. 287, 286, 1966
11. DAHLHEIM, H., P. Weber, I. Herold, K. Petschauer, and K. Thureau:
Preparative Methods to Purify the Renin Substrate
V. Symposium für Nephrologie, Lausanne
September 1967 "Progress in Nephrology"
Berlin-Heidelberg-New York, Springer
12. DAHLHEIM, H., P. Weber, I. Herold und K. Thureau:
Untersuchungen über präparative Anreicherungsmöglichkei-
ten des Reninsubstrats (Angiotensinogen)
Pflügers. Arch. 298, 131, 1967
13. DAHLHEIM, H., P. Weber und K. Thureau:
Untersuchungen über die Reaktionsgeschwindigkeit der
enzymatischen Angiotensinbildung in vitro in Abhängigkeit
von der elektrolytischen Zusammensetzung des Inkubations-
mediums.
Pflügers. Arch. 310, 137, 1969

14. DAHLHEIM, H., P. Weber und P. Walter:

Vergleichende reaktionskinetische Untersuchungen mit standardisiertem menschlichem Renin an vier angereicherten tierischen Reninsubstraten

Pflügers Arch. 317, 344, 1970

15. EIGLER, F., W.:

Regulierung von Glomerulumfiltrat und arteriellem Blutdruck durch den Natriumgradienten an den Macula densa Zellen

Klin. Wschr. 45, 23, 1967

16. FAARUP, P.:

Renin Location in the Different Parts of the Juxtaglomerular Apparatus in the Arteriole and the Macula Densa

Acta path. microbiol. scand. 71, 509, 1967

17. FRIEDBERG, F., C.:

Zonal Variations in the Juxtaglomerular Granules in Mice of Different Ages

Nephron 2, 230, 1965

18. FRIEDBERG, F., C.:

Distribution of Juxtaglomerular Granules. A Study of Mice on Salt-Restricted Diet

Arch. Path. 80, 621, 1965

19. GOORMAGHTIGH, N.:

Existence of an Endocrine Gland in the Media of the Renal Arterioles

Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 42, 688, 1939

20. GOULD, A., B., L.T. Skeggs, and J.R. Kahn:

Measurement of Renin and Renin Substrate Concentration in Human Plasma

Lab. Invest. 15, 1802, 1966

21. GRANGER, P., H. Dahlheim und K. Thureau:
Determination of Renin, Angiotensinase and Converting
Enzyme Activity in Microdissected Juxtaglomerular Appa-
ratus and Parts of the Nephron
Pflügers Arch. 312, R 87 1969
22. GROSSMANN, W.:
Grundzüge der Ausgleichsrechnung
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1953
23. HAAS, E., H. Lamfrom, and H. Goldblatt:
A Simple Method for the Extraction and Partial Purification
of Renin
Arch. Biochem. 48, 256, 1954
24. HAAS, E., H. Goldblatt, and E.C. Gipson:
Extraction, Purification and Acetylation of Renin and the
Production of Antirenin to Human Renin
Arch. Biochem. 110, 534, 1965
25. HAAS, E., and H. Goldblatt:
Kinetic Constants of the Human Renin and Human Angioten-
sinogen Reaction
Circulat. Res. 20, 45, 1967
26. HARTROFT, P., M., L.E. Sutherland, and W.S. Hartroft:
Juxtaglomerular Cells as the Source of Renin: Further Stu-
dies with the Fluorescent Antibody Technique and the Effect
of Passiv Transfer of Antirenin
Canad. med. Ass. J. 90, 163, 1964
27. HELMER, O., M., and I.H. Page:
Purification and Some Properties of Renin
J. Biol. Chem. 127, 757, 1939

28. HELMER, O., M., and W.E. Judson:

Quantitative Determination of Renin in Plasma of Patients
with Arterial Hypertension

Circulation 27, 1050, 1963

29. HELMER, O., M., and W.E. Judson:

Influence of High Renin Substrate Levels on Renin-Angioten-
sin System in Pregnancy

Am. J. Obst. and Gynec. 99, 9, 1967

30. LATTI, H., and A.B. Maunsbach:

The Juxtaglomerular Apparatus as Studied Electron Micro-
scopically

J. Ultrastruct. Res. 6, 547, 1962

31. LELOIR, L., F., J.M. Munoz, A.C. Taquini, E. Braun-Menendez y
J.C. Fasciolo:

La Formacion del Hypertensinogeno

Rev. argent. Cardiol. 9, 269, 1942

32. LEVER, A., F., J.I.S. Robertson, and M. Tree:

The Estimation of Renin in Plasma by an Enzyme Kinetic
Technique

Biochem. J. 91, 346, 1964

33. LINEWEAVER, H., and D. Burk:

The Determination of Enzyme Dissociation Constants

J. Am. chem. Soc. 56, 658, 1934

34. MICHAELIS, L. und M.L. Menten:

Kinetics of Invertase Activity

Biochem. Z. 49, 333, 1913

35. MONTAGUE, D., B. Riniker, and F. Gross:
Kinetics of the Renin-Substrat Reaction Employing a Synthetic Substrate
Amer. J. Physiol. 210, 595, 1966
36. NETTER, H.:
Theoretische Biochemie
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959
37. PAGE, I., H., B. McSwain, G.M. Knapp, and W.D. Andrus:
The Origin of Renin-Activator
Amer. J. Physiol. 135, 214, 1941
38. PICKENS, P., T., F.M. Bumpus, A.M. Lloyd, R.R. Smeby, and I.H. Page:
Measurement of Renin Activity in Human Plasma
Circulat. Res. 17, 438, 1965
39. PLENTL, A., A., I.H. Page, and W.W. Davies:
The Nature of Renin Activator
J. biol. Chem. 147, 214, 1941
40. PLENTL, A., A., and I.H. Page:
A Kinetic Analysis of the Renin-Angiotensin Pressor System and the Standardization of the Enzyme Renin and Angiotonase
J. Exptl. Med. 78, 367, 1943
41. POULSEN, K.:
Microtechnique for Quantitative Measurement of Renin in Plasma
Acta path. microbiol. scand. 69, 19, 1967
42. POULSEN, K.:
Measurement of Renin in Human Plasma
Scand. J. clin. Lab. Invest. 21, 49, 1968

43. ROBERTSON, A., C., R.R. Smeby, F.M. Bumpus, and I.H. Page:
Production of Renin by Human Juxtaglomerular Cells in vitro
Circulat. Res. 18 Suppl. I, 131, 1966
44. SKEGGS, L., T., J.R. Kahn, and N.P. Shumway:
The Preparation and Function of the Hypertensin Converting
Enzyme
J. exp. Med. 103, 295, 1956
45. SKEGGS, L., T., K.E. Lentz, J.R. Kahn, and H. Hochstrasser:
Studies on the Preparation and Properties of Renin
Circulat. Res. Suppl. 91, 1967
46. SKINNER, S., L.:
Improved Assay Methods for Renin "Concentration" and
"Activity" in Human Plasma
Methods Using Selective Denaturation of Renin Substrate
Circulat. Res. Vol. XX, 391, 1967
47. SKINNER, S., L., J. McCubbin, and I.H. Page:
Control of Renin Secretion
Circulat. Res. 15, 64, 1964
48. SKINNER, S., L., E.R. Lumbers, and E.M. Symonds:
Alteration by Oral Contraceptives of Normal Menstrual
Changes in Plasma Renin Activity, Concentration and Sub-
strate
Clin. Sci. 36, 67, 1969
49. SKINNER, S., L., E.R. Lumbers, and E.M. Symonds:
Analysis of Changes in the Renin-Angiotensin-System
During Pregnancy
Clin. Sci. 42, 479, 1972

50. SZALAY, K., S., and A. Gyevai:
Renin Production by Tissue Cultures of Renal Cortex
Life Sci. 6, 925, 1967
51. THURAU, K. und J. Schnermann:
Die Natriumkonzentration an den Maculadensazellen als
regulierender Faktor für das Glomerulumfiltrat (Mikro-
punktionsergebnisse)
Klin. Wschr. 43, 410, 1965
52. THURAU, K.:
In: Krück, F. (Hrsg.): Aktuelle Probleme der Nephrologie
IV. Symposion der Gesellschaft für Nephrologie 1965
(Berlin-Heidelberg-New York 1966)
53. TIGERSTEDT, R. und P.G. Bergman:
Niere und Kreislauf
Skand. Arch. Physiol. 8, 223, 1898
54. TOBIAN, L., J. Janacek, and A. Tombouliau:
Correlation between Granulation of Juxtaglomerular Cells and
Extractable Renin in Rats with Experimental Hypertension
Proc. Soc. exp. Biol. (NY) 100, 94, 1959
55. TOBIAN, L.:
Interrelationship of Electrolytes, Juxtaglomerular Cells, and
Hypertension
Physiol. Rev. 40, 280, 1960
56. VANDER, A., J., and R. Miller:
Control of Renin Secretion in the Anesthized Dog
Amer. J. Physiol. 207, 537, 1964
57. VANDER, A., J.:
Control in Renin Release
Physiol. Rev. 47, 359, 1967

LEBENS LAUF:

Geboren am 25. Januar 1941 in Berlin,

Eltern: Hans-Georg Weber und Helga Weber, geb. Albrecht.

Verheiratet seit 1969 mit Frau Hildegard W., geb. Mühlig.

Schulzeit: 1947 bis 1948 in Berlin (Grundschule),
1948 bis 1958 in Potsdam (Grund- und Oberschule),
1958 bis 1962 in Berlin (Oberschule),
im März 1962 Abitur an der Paul-Natorp-Schule in Berlin.

Studium: SS 1962 bis SS 1965 an der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin,
WS 1965/66 an der Medizinischen Fakultät der Universität
Innsbruck,
SS 1966 bis SS 1968 an der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin,
Abschluß durch Staatsexamen am 3. Oktober 1968.

Medizinalas-

sistentenzeit: 17 Monate von November 1968 bis Mai 1970:

- 3 Monate im Gesundheitsamt Berlin-Steglitz,
- 10 Monate in der Medizinischen Klinik der Freien Universität
Berlin im Klinikum Steglitz,
- 2 Monate in der Chirurgischen Abteilung des Städtischen
Krankenhauses Berlin-Wannsee,
- 2 Monate in der Städtischen Klinik für Lungenkranke Heckes-
horn in Berlin-Wannsee.

Approbation am 31. Mai 1970.

Seit 1. August 1970 tätig als wissenschaftlicher Assistent am Strahlen-
Institut / Klinik der Freien Universität (Direktor: Prof. Dr. H. Oeser) im
Klinikum Steglitz.

Druck:

Der Präsident der Freien Universität Berlin

- Universitätsdruckerei -

1 Berlin 41, Kelchstraße 31

